

LIBRARY

UNIVERSITY OF
CALIFORNIA
SAN DIEGO

BIOMEDICAL LIBRARY
UNIVERSITY OF CALIFORNIA, SAN DIEGO
LA JOLLA, CALIFORNIA

BOOKBINDERS
CHAS. ELCE
& SON
LINCOLN, NEBR.

W1

= 2E720

V. DP

CM

LIE
UNIV
CAL
SAR

CENTRALBLATT

für

Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten

Centralblatt für
Bakteriologie

Erste Abt.

Originale

Vol. 108

1928

Lb 32

Mit 68 Abbildungen im Text und 10 Tafeln



Jena

Verlag von Gustav Fischer

1928

Centralblatt für
Bakteriologie
Erste Abt.
Originale
Vol. 108
1958

L 235

CENTRALBLATT

für

Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten

In Verbindung mit

Prof. Dr. R. Abel,
Geh. Obermed.-Rat in Jena

Prof. Dr. M. Braun,
Geh. Reg.-Rat in Königsberg

Prof. Dr. K. Kißkalt,
Geh. Med.-Rat, München

Prof. Dr. R. Pfeiffer
Geh. Med.-Rat in Breslau

herausgegeben von

Prof. Dr. O. Uhlworm, Präsident Dr. A. Weber
Geh. Reg.-Rat in Bamberg in Dresden

und

Prof. Dr. E. Gildemeister,
Ober-Reg.-Rat, Berlin-Lichterfelde-W.

Erste Abteilung. 108. Band

Medizinisch-hygienische Bakteriologie
und tierische Parasitenkunde

Originale

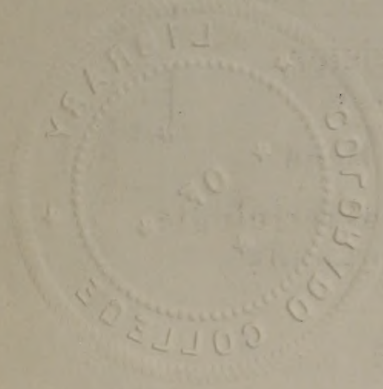
Mit 68 Abbildungen im Text und 10 Tafeln



Jena

Verlag von Gustav Fischer
1928

Printed in Germany.



Ausgegeben am 25. Juli 1928.

Nachdruck verboten.

Zur Frage der Züchtung der Tuberkelbazillen im negativen Auswurfe.

[Aus dem Reichslaboratorium für Chemie und Bakteriologie und Laboratorium des Roten Kreuzes].

Von Dr. **Ignaz Schiller**, Odessa.

Einleitung.

Wir haben vor 3 Jahren in dieser Zeitschrift¹⁾ ein Verfahren angegeben, welches uns erlaubt, im negativen Auswurfe der Tuberkulosekranken nach 24—48 Std. Tuberkelbazillen nachzuweisen. Das Verfahren besteht darin, daß im Auswurfe Bedingungen geschaffen werden, daß die Tuberkelbazillen ungestört von anderen Bakterien, besonders von Fäulnisbakterien, zur Entwicklung gelangen. Es wird zum Auswurfe Glycerin in hoher Konzentration zugesetzt, um einerseits die ausgesprochene Glycerinophilie bei Tuberkelbazillen zu befriedigen und andererseits, um womöglich die Begleitbakterien in der Entwicklung zu hemmen. Um die Fäulnisgärung zu beseitigen, wurde dem Auswurfe Glukose zugesetzt. Die Säure, die durch die Fäulnisbakterien gebildet wird (auf Kosten des Zuckers), unterdrückt die Fäulnisgärung und begünstigt das Wachstum der Tuberkelbazillen.

Unser Nährboden besteht aus 75 Proz. Glycerin und 25 Proz. Aqua destillata, dem man 2,0—5,0 Glukose zugibt. Dem Auswurfe wird ein gleiches Volumen dieses Nährbodens zugesetzt. Er verbleibt 24 Std. im Brutschranke bei 37° C und gelangt nach dieser Zeit zur Untersuchung. Das regste Wachstum der Tuberkelbazillen erfolgt während der ersten 9 Tage.

Dank unserer Methode wurden im Auswurfe der Tuberkulosekranken (27 Fälle) 2. Stadiums (nach Turban) Tuberkelbazillen in 9 Fällen (33 Proz.) und säurefeste Saprophyten in 3 Fällen (11 Proz.) nachgewiesen. In 38 negativen Auswürfen der Kranken 1. Stadiums wurden Tuberkelbazillen 3mal (8 Proz.) und säurefeste Saprophyten 10mal (28 Proz.) nachgewiesen. Bei 45 gesunden Personen fanden wir die säurefesten Saprophyten 10mal (22 Proz.).

Fr. Schmidt und A. Sylla²⁾ haben unsere Methode einer Nachprüfung unterzogen. Außerdem haben sie die nach unserer Methode ermittelten Resultate mit denjenigen, welche sie nach Petroff, Küss, Liebenau, Isabolinsky und Gitovitsch erlangt haben, verglichen und sind zu folgendem Ergebnis gelangt: Es unterliegt keinem Zweifel, daß im Schillerschen Nährboden die Tuberkelbazillen sich vermehren. Der beste Beweis dafür ist, daß auf einzelnen Präparaten eine echte Bazillennesterbildung dort zu beobachten war, wo früher die Bazillen nur isoliert vorhanden waren. Die Zahl der von Schmidt und Sylla untersuchten Fälle, die sich sowohl mikroskopisch, als auch durch Antiforminverfahren als negativ erwiesen, betrug 40, darunter befanden sich 35 Sputa und 5 Urine.

1) Ignaz Schiller, Vorversuche zur Züchtung der Tuberkelbazillen und säurefesten Saprophyten im Auswurfe. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 96. 1925. H. 2.)

2) Schmidt, Fr., u. Sylla, A., Zur Frage der Züchtung von Tuberkelbazillen aus mikroskopisch negativem Material. (Ztschr. f. Tuberkul. Bd. 45. 1926. H. 5.)

Es wurden stets Tierversuche angestellt und die Ergebnisse der Züchtungsverfahren damit verglichen. Die Tiere wurden 12 Wochen beobachtet. Bei sämtlichem Material wurde darauf geachtet, daß nur klinisch stark verdächtige, aber mikroskopisch negative Fälle zur Verarbeitung kamen. Von diesen 40 Fällen erwiesen sich im Tierversuch 8 Sputa und 1 Urin als positiv. Von den Nährböden ergaben nur der Schillersche und der natursaurer wie auch der durch Zitronensäure auf $pH = 6,4-6,6$ eingestellte Petroffsche Nährboden in je 2 Fällen (Sputa) ein positives Ergebnis, während auf sämtlichen anderen Nährböden Wachstum von Tuberkelbazillen nicht zu erkennen war. Der Schillersche Nährboden hat allen erwähnten festen Nährsubstraten gegenüber den Vorzug, daß die Bazillen sich in kurzer Zeit vermehren (Schiller vom 1.—9. Tage an, Petroff vom 9. Tage an), steht jedoch dem Petroffschen Nährboden an Zuverlässigkeit nach.

H. Kahan und L. Seidenberg¹⁾ haben auch unsere Methode einer Nachprüfung unterzogen. Sie fanden im negativen Auswurfe, den sie nach Schiller bearbeiteten, die Tuberkelbazillen in 3 Fällen (6 Proz.). Untersucht wurden 49 Auswürfe. Sie konnten einen sehr interessanten Befund bestätigen, nämlich, daß in dem nach unserer Methode bearbeiteten Auswurfe oft auch säurefeste Saprophyten zum Vorschein kommen. Bekanntlich ist im tuberkulösen Sputum das Vorkommen von säurefesten Stäbchen, die keine Tuberkelbazillen sind, so selten daß praktisch jedes nach Ziehl-Neelsen gefärbte Stäbchen als Tuberkelbazillus angesehen wird. Es ist beobachtet bei Ozaena, sowie in Fällen von Lungengangrän, Bronchiektasie und putriden Bronchitis. Diese säurefesten Saprophyten sind schlanker, starrer, gerader als die Tuberkelbazillen. Bei dem kleinen Material das Kahan und Seidenberg¹⁾ bearbeitet haben, ist ihnen das säurefeste Stäbchen (saprophyte) wiederholt begegnet.

Damit ist der Schluß erlaubt, daß unser Nährboden auch die Entwicklung der säurefesten Saprophyten im Auswurfe begünstigt, was vielleicht vom ätiologischen Standpunkte aus nicht ohne Interesse ist.

Wir möchten noch bemerken, daß die von Schmidt und Sylla, Kahan und Seidenberg angegebenen Zahlen der positiven Befunde in den nach unserer Methode bearbeiteten Auswürfen keinen Vergleich mit unseren Zahlen zu ziehen erlauben, da bei ihnen das Material nicht nach seiner klinischen Angehörigkeit (Stadien der Krankheit) klassifiziert wurde.

Technik.

In unseren Vorversuchen zur Züchtung der Tuberkelbazillen und säurefesten Saprophyten im Auswurfe haben wir auf die Schwierigkeit hingewiesen, der man beim Färben des Präparates nach Ziehl-Neelsen begegnet. Da das Glycerin am Auswurfe und den Stäbchen mit großer Zähigkeit haftet, gelingt eine Färbung erst nach sorgfältiger Waschung des Präparates. Wir sagten, daß das Karbolfuchsin auf dem Objektträger 3—4mal bis zum Evaporieren erwärmt und das Enrfärben womöglich mit schwacher Säurelösung vorgenommen werden müsse.

Schmidt und Sylla, Kahan und Seidenberg sind auch dieser Schwierigkeit begegnet und suchten sich damit zu helfen, daß sie zum Auswurfe zwecks Befreiung desselben von Glycerin Wasser zusetzten und ihn einer scharfen Zentrifugation unterzogen. Da infolge des scharfen Zentrifugierens eine Zusammendrängung der Bazillen auf einen kleinen Raum im Zentrifugierglas entstand, so glauben die Autoren, daß die in einer Anzahl von Fällen von ihnen bemerkte starke Vermehrung der Bazillenzahl pro Gesichtsfeld durch das Zentrifugieren zu erklären sei. Wir möchten dazu bemerken, daß der nach unserer Methode bearbeitete Auswurf wochenlang seine natürliche Konsistenz behält. Durch das Zentrifugieren werden bekanntlich die Tuberkelbazillen nur im homogenisierten, aber niemals im gut erhaltenen Auswurfe zusammen gedrängt. Der gut erhaltene Auswurf nimmt gewiß im Zentrifugierglas ein kleineres Volumen ein, bei Anfertigung der Präparate aber muß die Dichte

1) Kahan, H., u. Seidenberg, C., Vermehren sich Tuberkelbazillen in dem nach J. Schiller bearbeiteten Sputum? (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 85. 1926. S. 30).

desselben aus optischen Gründen derjenigen eines natürlichen Auswurfes entsprechen. Deswegen ist der von den erwähnten Autoren ausgesprochene Verdacht, die Vermehrung der Bakterien im nach unserer Methode bearbeiteten Auswurfe sei in manchen Fällen durch mechanische Ursachen bewirkt, nach unserer Ansicht nicht stichhaltig. Die Tatsache, daß Kahan und Sandberg im negativen Auswurfe, den sie nach unserer Methode bearbeiteten, säurefeste Saprophyten beobachten konnten, spricht selbstverständlich gegen das durch das Zentrifugieren bewirkte Zusammendrängen der Tuberkelbazillen.

Wie wir gleich sehen werden, wird übrigens das Zentrifugieren beim Auswaschen des Auswurfes bei uns niemals angewendet.

Wir haben seit unserer 1. Mitteilung ein großes Material nach unserer Methode bearbeitet und die Technik wesentlich vereinfacht, so daß die mikroskopische Untersuchung des Auswurfes ebenso leicht geworden ist, wie diejenige eines natürlichen.

Die Technik in der 1. Mitteilung wurde nur kurz angedeutet, was leider zu manchen Mißverständnissen führte. Deswegen wollen wir hier dieselbe ganz ausführlich beschreiben.

Es wird eine Lösung, bestehend aus 75 ccm Glyzerin, 2,0—5,0 Glukose und 25 ccm Aqua destillata vorbereitet. Diese Lösung ist praktisch bakterienfrei und braucht, wie wir uns überzeugt haben, nicht sterilisiert zu werden, da sie monatelang unverändert bleibt. Zu dem Auswurfe wird ein gleiches Volumen dieses Nährbodens zugesetzt. Da bekanntlich die Tuberkelbazillen sich am besten unter aeroben Bedingungen (bei 37° C) entwickeln, ist es ratsam, die Züchtung in Petri-Schalen auszuführen. Die 1. Untersuchung geschieht nach 24 Std. Zur Färbung wird ein gewöhnliches Ausstrichpräparat angefertigt, das Glyzerin langsam und schonend auf der Flamme evaporiert. Nach der Evaporation fixiert man das Präparat auf der Flamme. Die letzten Reste des Glyzerins werden jetzt durch kochendes Wasser gewegewaschen.

Die Färbung nach Ziehl-Neelsen wird in der üblichen Weise ausgeführt und bietet keine Schwierigkeiten.

Wir haben unser Verfahren als Züchtung der Tuberkelbazillen bezeichnet. Das ist gewiß richtig, denn die Tatsache des Wachstums der Tuberkelbazillen in unserem Nährboden ist von uns und den oben zitierten Autoren einwandfrei festgestellt worden¹⁾. Wir müssen aber betonen, daß richtige Tuberkelbazillenkulturen, wie sie auf den üblichen Nährböden zum Vorschein kommen, im Auswurfe niemals erzielt werden. Das regste Wachstum der Tuberkelbazillen fällt auf die ersten 9 Tage, um später einem gewissen Stillstande Platz zu machen. Eine Verminderung der Bazillenzahl, wie sie Schmidt und Sylla beschrieben haben, wurde auch von uns beobachtet, aber niemals in den ersten Tagen, sondern nach 12—14 Tagen. Wir wollen damit nicht behaupten, daß gelegentlich die Tuberkelbazillen im Auswurfe auch in den ersten Tagen eine Rückbildung erfahren könnten. Das Nichtangehen und Absterben von lebensfähigen Tuberkelbazillen auf den üblichen Nährböden, sogar auf den besten, gehört nicht zur Seltenheit.

Da unsere Methode nur praktischen Zielen dienen muß und bestrebt ist, möglich schnell, nach 24—48 Std. und in der einfachsten Weise, in dem negativen Auswurfe die Tuberkelbazillen zu ermitteln (wir haben hauptsächlich die Bedürfnisse der Tuberkulosefürsorgestellten im Auge), so ist es begreiflich, daß die Gewinnung von reinen Kulturen uns fern lag.

1) Nach Ján Hatrik (Beitrag zur Züchtung des Tuberkulosebazillus aus dem Auswurfe, Brateslarske lerkaiske listy. Jg. 7. No. 1. 1927) verdoppeln sich die Tuberkelbazillen in den nach Schiller bearbeiteten Auswürfen nach 24—48 Std.

Experimenteller Teil.

Bevor wir zu neuen Versuchen mit unserem Nährboden übergehen, wollen wir hier ganz kurz über die Resultate, die wir mit der neuen Technik der Färbung des Glycerin-Glukoseauswurfes erzielt haben, berichten.

In bezug auf den negativen Auswurf der Tuberkulosekranken des 2. Stadiums (nach Turban) sind unsere Resultate gleich denjenigen, die wir schon veröffentlicht haben. Die Tuberkelbazillen wurden in $\frac{1}{3}$ (33 Proz.) der negativen Auswürfe gefunden. Die letzten wurden nach Loewenstein-Sumiyoshi voruntersucht. Im ganzen wurden 30 Fälle untersucht. Die Auswürfe (39) der Tuberkulosekranken des 1. Stadiums (nach Turban) wurden nach der Hydrolysenmethode von Bezançon voruntersucht und erwiesen sich alle als negativ. Wir aber fanden in diesen Auswürfen nach Zusatz unseres Nährbodens die Tuberkelbazillen in 5 Fällen (13 Proz., gegen 8 Proz., die wir früher erzielt haben¹).

Alle unsere Resultate wurden spätestens nach 3 Tagen erhalten.

A. Zur Frage der Vermehrung der Tuberkelbazillen auf den künstlichen Nährböden mit einem hohen Glyzeringehalt.

Wie schon angegeben, besteht unser Nährboden aus einer 75proz. Glycerinlösung (75,0 Glycerin, 25,0 Aqua destillata, 2,0—5,0 Glukose).

Da dem Sputum dasselbe Volumen des Nährbodens zugesetzt wird, so besteht der fertige Nährboden, in dem sich die Tuberkelbazillen entwickeln müssen, aus 37,5 Proz. Glycerin. Die Frage des Glycerinoptimums in den Nährböden wurde schon öfters erörtert, was aber die Toleranz der Tuberkelbazillen für konzentrierte Glycerinlösung anbetrifft, so konnten wir in der Literatur keine diesbezüglichen Angaben finden. Zur Lösung dieser Frage haben wir Kartoffel- und Agarnährböden, die 37,5 Proz. Glycerin enthielten, mit Tuberkelbazillen geimpft. Auf keinem der erwähnten Nährböden konnten sich aber die Tuberkelbazillen entwickeln. Da wir aber in einwandfreier Weise (s. oben) nachgewiesen haben, daß die Tuberkelbazillen im 37,5proz. Glycerin-Glukoseauswurf sich sehr schnell vermehren (sie haben in bezug auf die Schnelligkeit des Wachstums einen Vorsprung anderen Nährböden gegenüber²), so sind wir zu der Annahme berechtigt, daß das Sputum für die Tuberkelbazillen wachstumsfördernde Substanzen enthält.

Die Frage, ob die wachstumsfördernden Substanzen nur in den Sputis der Tuberkulosekranken vorhanden sind, kann zurzeit nicht gelöst werden, da gegenwärtig kein Sputum mit Sicherheit als nicht tuberkulös anerkannt werden kann. Deswegen können wir dieser Frage nur ein theoretisches Interesse beimessen.

B. Die Tuberkelbazillen im hydrolysierten Sputum.

Die Tuberkelbazillen entwickeln sich nicht nur im frischen Glycerin-Glukoseauswurf, sondern auch im durch Fäulnisbakterien hydrolysierten Auswurf, dem Glycerin und Glukose beigesetzt wurde. Bekanntlich wird die Hydrolyse als eine Art von Homogenisierung zur Anreicherung von Tuberkelbazillen verwendet. Die Methode wurde zuerst von Ellermann und Erlandsen beschrieben und später durch Bezançon modifiziert. Obwohl sie sich sehr gut bewährt hat, wird von manchen Autoren (Lerion, Ch. Richet fils et Paul Hauduroy³) hervorgehoben, daß in einigen Fällen die Tuberkelbazillen anstatt

J. Schiller, l. c.

2) Fr. Schmidt und A. Sylla, l. c.

3) Charles Richet fils et Paul Hauduroy. (Compt. Rend. Soc. de Biologie. T. 105. 1926. No. 26).

in größerer Zahl hervorzutreten, weniger Zahlreich werden; sie können sogar ganz verschwinden. Die Meerschweinchen, die mit einem Material, aus dem die Tuberkelbazillen verschwunden sind, geimpft werden, bleiben dauernd gesund. Die Bakteriolyse im hydrolysierten Auswurfe kann schon vom 2. Tage an beginnen und dauert bei 37° ungefähr 10—15 Tage. Sie wird viel deutlicher, wenn man den Auswurf mit Wasser verdünnt. (Bekanntlich werden Tuberkelbazillen aus den üblichen Nährböden in physiologischer Kochsalzlösung und Peptonwasser nicht bakteriolytisch).

Im sterilisierten, verdünnten und nicht verdünnten Auswurfe tritt die Bakteriolyse noch häufiger auf, als im nicht sterilisierten. Wir können die Angaben der eben genannten Autoren vollständig bestätigen. Wir haben 11 positive Auswürfe (ohne Zusatz von Peptonwasser oder physiologischer Kochsalzlösung) der Hydrolyse ausgesetzt. Die Auswürfe wurden öfters auf ihren Tuberkelbazillengehalt untersucht. Nach 2—4 Wochen wurde nach mehrmaligen Untersuchungen in 4 Auswürfen ein vollständiges Verschwinden der Tuberkelbazillen konstatiert. Mit diesen 4 Auswürfen haben wir Versuche angestellt, die zur Aufgabe hatten, festzustellen, ob das Verschwinden der Tuberkelbazillen im Auswurfe auf eine restlose Bakteriolyse der Tuberkelbazillen beruht, oder ob es sich bei dieser Erscheinung um ein unsichtbares (mikroskopisch) Stadium im Sinne von Fontés und anderen Autoren handelt.

Zu den 4 oben erwähnten negativ gewordenen Auswürfen wurde ein gleiches Volumen unseres Nährbodens zugesetzt.

Schon nach 24—48 Std. konnten wir bei 37° C in allen 4 Auswürfen die Tuberkelbazillen wiederfinden.

Fall Kr.: Am 15. 3. 1927 B. K. 30—40 pro Gesichtsfeld. — Am 30. 3. 27 keine B. K. vorhanden. Zusatz des Nährbodens. — Am 31. 3. 27 B. K. 25 pro 18 Gesichtsfelder.

Fall Kün.: Am 16. 3. 27 B. K. mehr wie 100 pro Gesichtsfeld. — Am 31. 3. 27 keine B. K. vorhanden. Zusatz des Nährbodens. — Am 1. 4. 27 B. K. 16 pro 7 Gesichtsfelder.

Fall Ch.: Am 25. 3. 27 B. K. 60—70 pro Gesichtsfeld. Am 3. 4. 27 keine B. K. vorhanden. — Zusatz des Nährbodens. — Am 5. 4. 27 B. K. 1—2 pro 3—5 Gesichtsfelder.

Fall Lam.: Am 2. 4. 27 B. K. 50—100 pro Gesichtsfeld. — Am 12. 4. 27 keine B. K. vorhanden. Zusatz des Nährbodens. — Am 13. 4. 27 B. K. 1 pro 3 Gesichtsfelder.

Diese Versuche beweisen, daß die Tuberkelbazillen nicht nur im negativen Sputum (nach Zusatz von Glukose und Glyzerin), zur Entwicklung gelangen, sondern daß auch im negativ gewordenen (hydrolysierten) Auswurfe nach Zusatz des Nährbodens die Tuberkelbazillen sich aufs neue entwickeln.

Was die aufgeworfene Frage anbetrifft, ob die Tuberkelbazillen im hydrolysierten Auswurfe aufgelöst werden, oder ob sie in eine unsichtbare Form im Sinne von Fontés übergehen, so scheint uns die letztere Hypothese annehmbar zu sein. Gewiß können auch partiell bakteriolytische Bakterien zu typischen Bakterien wiederwachsen. Das wissen wir aus den Versuchen mit Cholera-vibrien und Typhusbazillen, aber die biologischen Eigenschaften der Bakterien werden dabei nicht wesentlich beeinträchtigt. Ganz anders verhalten sich aber die Tuberkelbazillen im hydrolysierten Auswurfe.

Charles Richet fils und Paul Hauduroy¹⁾ haben 5 Meerschweinchen mit verdünntem und unverdünntem hydrolysierten Sputum, in dem die Tuberkelbazillen nicht mehr nachgewiesen waren, geimpft. Die Tiere blieben ganz gesund. 2 Meerschweinchen, welche mit 1 cem des hydrolysierten verdünnten Auswurfes mit seltenen Tuberkelbazillen geimpft wurden, blieben auch gesund. Ausstrichpräparate aus den Drüsen und der Leber der 7 Meerschweinchen wiesen keine Tuberkelbazillen auf.

Wir halten uns daher zur Annahme berechtigt, daß die Tuberkelbazillen im Laufe der Hydrolyse eine Form annehmen, die der filtrierbaren von Fontés

1) l. c.

nahe stehen. Sie können in die morphologisch typischen säurefesten Stäbchen übergehen, wenn man dem Auswurfe Glukose und Glyzerin zusetzt.

Im engen Zusammenhange mit dieser Frage steht das Problem der Möglichkeit, mit umgewandelten, apathogenen Tuberkelbazillen (im Auswurfe) die Tiere gegen pathogene Bazillen zu immunisieren. Da aber diese Frage über den Rahmen dieser Untersuchung hinausgeht, so wollen wir über diesbezügliche Untersuchungen in unserer nächsten Abhandlung berichten.

C. Tuberkelbazillen und tierisches Gewebe:

Wie schon erwähnt, vermehren sich die Tuberkelbazillen im Glyzerin-Glykosenährboden nur die ersten 2 Wochen, um später einem Stillstande Platz zu machen. Es ist aber nicht ausgeschlossen, daß dieser Stillstand durch Mangel an bestimmten wachstumsfördernden oder nutritiven Substanzen bedingt ist, weswegen wir versucht haben, durch Zusatz von verschiedenen Nahrungsstoffen zu unserem Nährboden den Tuberkelbazillen ein dauerndes Wachstum zu sichern. Hier wollen wir nur über unsere Versuche mit tierischem Gewebe berichten: Es wurden folgende Versuche angestellt: dem positiven Glyzerin-Glukoseauswurfe wurden a) fein zerschnittene, frische Meerschweinchenleber (1 Leber auf 100 ccm unseres Nährbodens) oder b) fein zerschnittene Meerschweinchenlunge (2 Lungen auf 100 ccm des Nährbodens) zugesetzt. Zur Kontrolle diente ein positiver Auswurf mit unserem Glyzerin-Glykosenährboden. Die Auswürfe wurden im Brutschranke bei 37° C während 24—48 Std. gehalten und dann untersucht. Am besten entwickelten sich die Tuberkelbazillen im Glyzerin-Glukoseauswurfe mit Lungengewebe, an der 2. Stelle steht der Nährboden mit Lebergewebe und zuletzt der Nährboden ohne Gewebe.

In Zahlen ausgedrückt, ist das Verhältnis der einzelnen Nährböden zueinander wie 2,28:2,27:1. Diese Resultate waren für uns überraschend, denn, wie wir aus den Versuchen aus der Literatur erfuhren¹⁾, gehen, wenn man Tuberkelbazillen (aus den Kulturen) mit steril entnommenen Gewebe in Berührung bringt, sie in kurzer Zeit zugrunde. Da diese Bakteriolyse weder durch die verwendete Glyzerinlösung, noch durch Glukose des Nährbodens gehemmt wird²⁾, so glauben wir, auch hier annehmen zu müssen, daß der Widerstand gegen das bakteriolytische Vermögen des tierischen Gewebes nur seitens des Auswurfes geleistet wird.

Es ist anzunehmen, daß im Sputum Substanzen vorhanden sind, die der Bakteriolyse des Gewebes entgegenreten. Welcher Natur diese Substanzen sind, wird die zukünftige Forschung entscheiden. Die Vermehrung der Bazillen im Auswurfe in Gegenwart von Meerschweingewebe erreicht ihr Maximum ungefähr am 9. Tage, um nach dieser Zeit in ein Ruhestadium überzugehen. Es kommt also auch hier niemals zur Bildung echter Tuberkelbazillenkulturen. In einigen Fällen haben wir sogar nach 18—20 Tagen eine Verminderung der Anfangszahl beobachten können. Aber die Tatsache, daß die Tuberkelbazillen im Auswurfe in Gegenwart vom tierischen Gewebe, sich entwickeln können, wurde von uns in einer großen Zahl von Versuchen festgestellt.

Zusammenfassung.

1) Vor der Färbung des Glyzerin-Glukoseauswurfes muß das Präparat von Glyzerin befreit werden. Nach Evaporieren desselben auf dem Objektträger

1) Charles Richet fils, l. c. T. 96. 1927. No. 13.

2) Die Wirkung der meisten Fermente in einer 37,5proz. Glyzerinlösung wird abgeschwächt, aber nicht aufgehoben.

und nach der Fixierung müssen die letzten Reste des Glyzerins mit kochendem Wasser gewaschen werden. — 2) Auf den üblichen Laboratoriumsnährböden, die einen gleichen Glyzeringehalt aufweisen, wie unser Auswurf Nährboden, können die Tuberkelbazillen sich nicht vermehren. Es ist daher anzunehmen, daß die störende Wirkung des Glyzerins durch besondere, im Sputum vorhandene Substanzen, aufgehoben wird. — 3) Die Tuberkelbazillen, die nach Hydrolyse des positiven Auswurfes (bei 37° C) aus demselben verschwunden sind, können, wenn man dem hydrolysierten Auswurfe unseren Nährboden zugibt, aufs neue sich entwickeln. — 4) Das sterile tierische Gewebe löst die Tuberkelbazillen (aus den Kulturen) in sehr kurzer Zeit auf. Dagegen werden die Tuberkelbazillen im Glyzerin-Glukoseauswurfe, dem tierisches Gewebe zugesetzt wird, zur raschen Vermehrung veranlaßt.

Nachdruck verboten.

Ueber den mikroskopischen Tuberkelbazillennachweis.

[Aus dem Institut f. Hygiene der Universität Marburg, L. (Direktor Geheimrat Prof. Dr. Bonhoff).]

Von Dr. **Kapeller**, Assistent.

Bis vor wenigen Jahren galt die Ziehl-Neelsen-Färbemethode zur Darstellung der Tuberkelbazillen ganz allgemein als die leistungsfähigste. Da das Verfahren einfach und rasch ausführbar ist, so ist es nicht verwunderlich, daß fast ausschließlich nur dieses praktisch Anwendung fand, umsomehr als die dazu notwendigen Farben und Flüssigkeiten — bis vielleicht auf den Alkohol — auch billig sind.

In neuester Zeit nun sind mehrfach Tuberkelbazillenfärbemethoden angegeben und empfohlen worden, die mir — abgesehen von den mitgeteilten guten Ergebnissen und der behaupteten teilweisen Ueberlegenheit gegenüber der von Ziehl-Neelsen — ihrer Begründung nach beachtenswert erschienen. Fast alle unterscheiden sie sich von letzterer entwedens durch das Entfärbungsmittel (Vermeidung der stark entfärbenden Mineralsäuren, z. B. durch Cépède, Konrich, Schulte-Tigges, Nagel), oder durch die Verwendung einer anderen Gegenfarbe bzw. durch den Verzicht auf eine solche überhaupt (z. B. die von Marx, Kayser, Ulrichs, Kronberger, Bender u. a.).

Bestimmend für die neueren Vorschläge waren neben dem Versuch der Steigerung der Leistungsfähigkeit auch das Bestreben nach Verbilligung der Methode durch Vermeidung des Alkohols. Aus der großen Anzahl dieser Neu-vorschläge habe ich 3 zum Vergleich mit der Ziehl-Neelsenschen Färbemethode herangezogen, weil sie einerseits der Forderung der Handlichkeit, Schnelligkeit und Billigkeit entsprachen und andererseits, weil sie durch die Auswahl der Entfärbungsmittel und Gegenfarben einen Schluß auf die Bedeutung dieser und jener für die Leistung des Verfahrens zuließen. Es sind dieses die Färbungen nach

Konrich: 1—2 Min. färben mit siedendem Karbolfuchsin, wasserspülen, makroskopisch völlige Entfärbung mit 10proz. Natriumsulfatlösung, wasserspülen, ½ Min. nachfärben mit wässriger Malachitgrünlösung (gesättigte wässrige M.-G.-Lösung 1 Teil + 2 Teile H₂O);

die Schulte-Tiggessche Modifikation der Konrichschen: 1 Min. nachfärben mit gesättigter wässriger Pikrinsäurelösung statt mit Malachitgrün;

die Bendersche Modifikation der Spenglerschen: 2 Min. färben mit siedendem Karbolfuchsin, wasserspülen, makroskopisch völliges Entfärben mit 3proz. HCl-Alkohol, wasserspülen, 1 Min. nachfärben mit gesättigter wässriger Pikrinsäurelösung.

Die Entfärbung mit Na-Sulfit nach Konrich ist, wie v. Bergen sich ausdrückt, „weniger brutal“, als die mit Säurealkohol, was schon daraus hervorgehen soll, daß sie (nach v. Bergen) bis zu 3—4 Tagen ausgedehnt, Tuberkelbazillen nicht zu entfärben vermag. Dagegen ist die Entfärbung des sonstigen Präparates praktisch vollkommen ausreichend. Es sei jedoch auch an dieser Stelle darauf hingewiesen, daß ein so günstiges Resultat nur bei Verwendung eines wirklich guten Na-sulfit-Präparates — am besten nach dem Vorschlage von Laubenheim des Natrium sulfurosum siccum, das doppelt so viel der wirksamen Substanz enthält, wie das kristallisierte Sulfit, und frischer Lösungen desselben erzielt wird. Auch der $\frac{1}{2}$ prom. Zusatz von Hydrochinon zur Erhöhung der Haltbarkeit der Sulfitlösung, vom letztgenannten Autor empfohlen, hat sich mir bewährt. Schon aus dieser Betrachtung heraus erscheint die von Konrich empfohlene Sulfitentfärbung als Fortschritt auf dem Gebiete der Tuberkelbazillenentfärbung. In der Tat bestätigen auch die Ergebnisse von Spreitzer, Bender, Bernblum, Mazza und Nino, Konrich, Schloßberger-Pfannenstiel, Gersbach, Knipping, Weitzmann und de Mestral dieses, während z. B. Zimmermann keinen Vorteil von der Sulfitentfärbung sah und Gate-Papacostas-Lacoste, Isobalinski-Gitowitsch und v. Bergen der altbewährten Ziehl-Neelsenschen Färbemethode den Vorzug geben, letzterer besonders wegen der ungenügend entfärbenden Wirkung des Sulfits und der Unbeständigkeit seiner Lösung.

Ferner läßt sich wohl kaum bezweifeln, daß die Gegenfärbung mit Methylblau bei der Ziehl-Neelsenschen Färbung eine Anzahl von Tuberkelbazillen der Diagnose entzieht. Sogar Reinkulturen einzelner Tuberkelbazillensämme, nach Ziehl-Neelsen gefärbt, zeigen gar nicht so selten, neben vorwiegend leuchtend roten Bazillen, vereinzelte, ausnahmsweise sogar ganze Komplexe, solcher, die mehr oder weniger die Gegenfarbe angenommen haben. In einem Präparate unbekannten Bazillengehaltes würden solche Tuberkelbazillen möglicherweise der Diganose entgehen. Ist die Gegenfarbe nun neben dem festgehaltenen Karbolfuchsin von den Bazillen aufgenommen worden und hat sie letzteres überdeckt? Oder ist das Methylblau bloß von den weniger säurealkoholfesten und daher mehr oder weniger entfärbten Individuen aufgenommen worden? In letzterem Falle ist die auftretende Blaufärbung gleichgültig, da sie nur das in einer für die Diagnose nicht verwendbaren Farbe sichtbar macht, was sonst wegen der Entfärbung überhaupt unsichtbar bliebe. Die Notwendigkeit ein „milderes“ Entfärbungsmittel zu verwenden, wäre damit gegeben. Ist aber das Methylblau in der Lage, mehr oder weniger den in den Tuberkelbazillen noch festgehaltenen roten Farbstoff zu überdecken, dann ließe sich die Ziehl-Neelsensche Färbung durch eine andere Gegenfarbe in ihrer Leistungsfähigkeit steigern. Tribondeau, Jötten-Haarmann und Bender versuchten es mit angeblich gutem Erfolge durch Verwendung von alkoholischer bzw. wässriger Pikrinsäurelösung, die ganz besonders auch durch ihre gewebesaufhellende Wirkung als Gegenfarbe geeignet erscheint. Auch das von Konrich benutzte Malachitgrün bedeutet wegen seiner relativ geringen Färbekraft möglicherweise einen Fortschritt. Die größte Beachtung verdient aber aus diesen Betrachtungen heraus die Schulte-Tiggessche Modifikation der Konrichschen Färbung, da sie die schonendere Entfärbung mit einer überaus zweckmäßigen Gegenfarbe, der Pikrinsäurelösung, verbindet.

Der Gang meiner Untersuchungen zur Klärung der aufgeworfenen Fragen war folgender: Reichlich ausgesuchten Materials (Linsen, Eiterbröckel aus Sputum) wurde zwischen 2 Objektträgern zerdrückt, das an jedem der beiden Objektträger klebende Material zwischen diesem und je einem weiteren sauberen nochmals gründlich zerdrückt und verrieben und auf möglichst gleichgroße Flächen verteilt. Es ist zu erwarten, daß unter diesen Verhältnissen — sofern nicht eine gar zu geringe Bazillenzahl im Ausgangsmaterial vorhanden war — auf jeden der 4 Objektträger eine annähernd gleiche Zahl von Tuberkelbazillen in annähernd gleicher Verteilung gelangt und müssen daher dieselben, bei gleicher Leistungsfähigkeit der Färbemethoden und gleich langem Suchen, gleich oft gefunden werden.

50 beliebige, dem hiesigen Untersuchungsamt zugegangene Sputa, auf diese Weise zu Katschpräparaten verarbeitet und nach ein und derselben Färbemethode gefärbt, zeigten, bei nicht zu kurz angesetzter Untersuchungszeit jedes Präparates, in allen 4 Präparaten immer ein gleich lautendes Ergebnis. Es scheint mir daher wohl berechtigt, in dieser Weise hergestellte Katschpräparate zur Beurteilung der Leistungsfähigkeit der Färbemethoden heranzuziehen. Für meine Untersuchungen habe ich je eines der 4 Präparate nach Ziehl-Neelsen, Konrich, Bender und Schulte-Tigges gefärbt.

Dagegen konnte ich mich nicht entschließen, Durchschnittszahlen pro Gesichtsfeld zur Beurteilung der Leistungsfähigkeit der Färbemethoden heranzuziehen. Auch bei Durchsicht einer sehr großen Zahl von Gesichtsfeldern ist das Ergebnis der Bestimmung zu sehr vom Zufalle abhängig. Oft ist die Durchschnittszahl einfach nicht bestimmbar, weil man auf Bazillenhaufen stößt, in denen die Individuen nicht zählbar sind. Vergleichbare Durchschnittswerte lassen sich eben nur bei einigermaßen gleichmäßiger Verteilung der Bazillen im Präparat und bei in jedem Falle zählbarer Anzahl pro Gesichtsfeld ermitteln, Voraussetzungen, die im Sputum-Originalpräparat sehr oft nicht gegeben sind. Diese Durchschnittszahlen pro Gesichtsfeld können somit wohl nur als Schätzungen betrachtet werden und sind sie als solche, gerade bei vergleichenden Untersuchungen, subjektiven Schwankungen zu sehr unterworfen und aus diesem Grunde von nur geringem Wert. Ich habe daher, im Gegensatz zu den meisten Untersuchern, auf eine „Bestimmung“ der Durchschnittszahlen pro Gesichtsfeld zur Beurteilung der Leistungsfähigkeit der Färbemethode ganz verzichtet.

Bevor ich auf die Ergebnisse meiner vergleichenden Untersuchungen, wie sie sich aus der Tabelle I ergeben, eingehe, will ich erst über Beobachtungen, die in derselben nicht in Erscheinung treten, berichten.

Es fanden sich ab und zu Sputa, in denen in den nach Ziehl-Neelsen gefärbten Präparaten den Tuberkelbazillen morphologisch gleichende Stäbchen sichtbar waren, deren Färbung aber vielfach nicht sicher erkennbar, manchmal aber auch mehr oder weniger deutlich blau war. Wurden die Präparate länger aufgehoben, so wurde mit der Zeit die Rotfärbung der Tuberkelbazillen scheinbar deutlicher, so als ob die schwach fuchsin gefärbten Bazillen die Gegenfarbe, das Methylenblau, aufgenommen hätten, das dann aber verhältnismäßig rasch verblaßte und das Rot wieder hervortreten ließ. Die entsprechenden Katschpräparate nach Konrich, Schulte-Tigges und Bender gefärbt, zeigten keine derartigen unsicher gefärbten, oder gar in der Gegenfarbe erscheinenden, Bazillen. Bei den mit Na-Sulfit entfärbenden Methoden hatte ich den Eindruck der durchschnittlich satteren, tiefer roten Färbung der Tuberkelbazillen. Es erscheint mir daher schon aus diesem Grunde in Uebereinstimmung mit Kayser, Marx, Ulrichs, Speitzer, Boit, Bender u. a. Autoren das Methylenblau als Gegenfarbe ungeeignet.

Abgesehen von der praktischen Bedeutung dieser erneuten Feststellung, dürfte die Frage interessieren, welche Tuberkelbazillen es sind, die einerseits das Fuchsin so schlecht aufnehmen, oder es so leicht wieder abgeben und andererseits sich verhältnismäßig leicht mit Methylenblau färben. Meist findet man die Ansicht vertreten, daß es sich dabei um regressiv veränderte, in Auflösung begriffene Bazillen handelt.

Die durch Schumacher-Liese, allerdings an Hefezellen, festgestellte Tatsache des Verschwindens in erster Linie der Methylenblaufärbung beim fermentativen Abbau der Zellen im tierischen Organismus, wäre eher in entgegengesetztem Sinne verwendbar.

Eigene Erfahrungen beim Züchten von Tuberkelbazillen aus dem Sputum Tuberkulöser scheinen dafür zu sprechen, daß keinesfalls die ausgesprochenen säurefesten Stäbchen ausschließlich und allein für die kulturelle Entwicklung in Frage kommen, vielleicht sind es auch weniger säurefeste, die Gegenfarbe mehr oder weniger annehmende Individuen, die dazu gehören. Dann dürfte es sich wohl kaum um regressiv veränderte handeln.

Nun zur Frage des praktischen Wertes der 4 angewandten Färbeverfahren für die Diagnose. An und für sich ist die Zahl der vergleichend untersuchten Sputa zu gering, um diese Frage definitiv zu entscheiden. Die in der Tabelle I zusammengestellten Ergebnisse gewinnen aber an Bedeutung im Zusammenhang mit den bereits geschilderten Beobachtungen und im Rahmen früherer, schon genannter Arbeiten zu dieser Frage, sowie der von Schoub, welcher ebenfalls die Schulte-Tiggessche Methode der Ziehl-Neelsenschen überlegen fand.

Tabelle I.

Anzahl der untersuchten Objekte	Davon mikroskopisch überhaupt Tb.-Bazillen positiv	Positiver Tb.-Bazillenbefund bei einer Färbung nach			
		Ziehl-Neelsen	Bender	Konrich	Schulte-Tiggess
338	53	48	50	53	53

Bei einer Gesamtzahl von 338 untersuchten Sputen erwiesen sich die Färbeverfahren, die mit Na-Sulfit als Entfärbungsmittel arbeiten, den mit Säurealkohol arbeitenden in 5 Fällen überlegen, während das Umgekehrte kein einziges Mal zur Beobachtung gelangte. Es scheint mir daher in der Tat der Hauptvorteil dieser neueren Färbemethoden im Entfärbungsmittel zu liegen. Aber auch das Methylenblau würde am besten als Gegenfarbe bei der Tuberkelbazillenfärbung verschwinden, denn wir sehen in der Tabelle I 2 Fälle verzeichnet, in denen das nach Ziehl-Neelsen gefärbte Präparat negativ war, während das nach Bender gefärbte säurefeste Stäbchen zeigte. Auch die nach Konrich und Schulte-Tiggess gefärbten Präparate zeigten in diesen zwei Fällen ein positives Ergebnis.

Es sind in neuerer Zeit wiederholt Zweifel darüber geäußert worden, z. B. von Konrich, Schulte-Tiggess u. a., ob die fast allgemein angenommene Ueberlegenheit der Anreicherungsverfahren, insbesondere mit Antiformin, gegenüber dem Tuberkelbazillennachweis im gewöhnlichen Ausstrichpräparat zu Recht besteht. Dem gegenüber sprechen sich Schmits-Brauer, Hundeshagen, Vogelbach, Voigt, Pfeiffer-Robitscheck, Machens, Fourest, Pröschold, Müller u. a. die sowohl mit dem Uhlenhuth-Xylanderschen Antiforminverfahren, als auch mit den Fällungsmethoden u. a. arbeiteten, auf Grund ihrer Untersuchungsergebnisse mehr oder weniger entschieden für die Ueberlegenheit der Anreicherung aus. Es erschien mir daher die Nachprüfung auch dieser Frage wünschenswert.

Tabelle II.

Anzahl der untersuchten Objekte	Davon mikroskopisch überhaupt Tb.-Bazillen-positiv	Im gewöhnlichen Ausstrichpräparat positiv	Im Antiforminverfahren positiv
149	29	26	28

In Tabelle II sind die Ergebnisse vergleichender Untersuchungen zur Beurteilung der Leistungsfähigkeit der Anreicherung mit Antiformin gegenüber dem der gewöhnlichen mikroskopischen Untersuchung zusammengestellt. Rein äußerlich sind diese Untersuchungen nicht sehr ergebnisreich, zu weitergehenden Schlüssen nicht berechtigend: 149 untersuchte Fälle, davon in 145 Fällen Uebereinstimmung des Ergebnisses beider Methoden; 3mal war das Antiforminverfahren überlegen, 1mal die gewöhnliche mikroskopische Untersuchung. Nimmt man jedoch die überhaupt positiven Fälle — 29 — heraus und errechnet den Prozentsatz der durch jede Methode gelieferten positiven Ergebnisse, so finden wir für das Antiforminverfahren 96,6 Proz. und für das einfache Präparat 89,7 Proz. — immerhin ein nicht ganz unbedeutende Ueberlegenheit des ersteren.

Wenn ich in diesen Zahlen auch keinesfalls den strikten Beweis für die Ueberlegenheit des Anreicherungsverfahrens sehen will — dazu ist die Anzahl der untersuchten Fälle doch zu gering — so läßt sich nun andererseits aber die Ueberlegenheit des gewöhnlichen mikroskopischen Präparates aus dieser Versuchsreihe erst recht nicht erschließen und darauf kommt es, meines Erachtens, an. Denn im Massenbetrieb dürfte das Antiforminverfahren — eine leistungsfähige, maschinell betriebene Zentrifuge vorausgesetzt — auch das einfachere, raschere und billigere sein. Der errechnete hohe Prozentsatz der positiven Ergebnisse bei gewöhnlicher mikroskopischer Untersuchung läßt sich nur bei Anfertigung mehrerer — etwa 4 — Präparate und deren peinlichster Durchmusterung erzielen. Rechnen wir für jedes mikroskopische Präparat im negativen Falle 10 Min., so käme auf jedes negative Sputum 40 Min. angestrengten Mikroskopierens. Die Zahl der täglich möglichen gewissenhaften Untersuchungen dürfte pro Untersucher daher recht gering sein. Eine derartige Untersuchung der Sputa auf Tuberkelbazillen ist daher gerade für Untersuchungsämter, die einen relativ sehr hohen Prozentsatz negative Fälle, beispielsweise gegenüber den Heilstätten, aufweisen, untragbar. Beim Antiforminverfahren dürfte man wohl fast immer mit einem Präparat auskommen, besonders unter Berücksichtigung der von Hundeshagen gemachten beachtenswerten Vorschläge (Verdünnung mit Aqua destillata nach erfolgter Homogenisierung u. a.) und wird schon allein hiermit, durch Herabsetzen des am meisten den Untersucher angreifenden und die längste Zeit in Anspruch nehmenden Mikroskopierens, viel gewöhnen.

Literatur.

- Bender, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 86. S. 461. — v. Bergen, Ebenda. Bd. 88. S. 600. — Bernblum, Ebenda. Bd. 87. — Boit, Beitr. z. Klin. d. Tuberk. Bd. 36. S. 227. — Cépède, Compt. rend. Acad. d. Scienc., Paris. T. 166. p. 357; Ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 69. S. 387. — Fourest, Compt. rend. Soc. d. Biol. 1923; Ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 76. S. 401. — Gaté-Papacostas-Lacoste, Ebenda. T. 84. 1921. p. 405; Ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 72. S. 544. — Gersbach, Med. Klin. 1924. S. 787. — Hundeshagen, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 82. S. 14. — Isobalinski-Gitowitsch, Ebenda. Abt. I. Orig. Bd. 94. S. 22. — Jötten-Haarmann, Münch. med. Wochenschr. 1920. S. 692. — Kayser, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 55. — Knipping, Münch. med. Wochenschr. 1924. S. 720. — Konrich, Dtsch. med. Wochenschr. 1920. S. 741 u. 1923. S. 852. — Kronberger, Ztschr. f. Tuberk. Bd. 25. S. 108. — Laubenheim, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 91. S. 78. — Machens, Dtsch. tierärztl. Wochenschr. 1923. D. 13; Ref. Centralbl. f. Bakt.

Abt. I. Ref. Bd. 76. S. 401. — Marx, Münch. med. Wochenschr. 1919. S. 416. — Mazza-Nino, La pressa med. Argent. 1921; Ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 72. S. 545. — de Mestral, Schw. med. Wochenschr. 1921. S. 873. Ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 73. S. 304. — Müller, Ztschr. f. Tuberk. 1926. Bd. 44. S. 318. — Nagel, Dtsch. med. Wochenschr. 1923. S. 1441. — Pfeiffer-Robitscheck, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 87. S. 27. — Pröschold, Dtsch. tierärztl. Wochenschr. 1923. S. 312; Ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 76. S. 429. — Schloßberger-Pfannenstiel, Dtsch. med. Wochenschr. 1920. S. 1213. — Schmits-Brauer Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 81. S. 339. — Schoub, Journ. of Bact. 8. S. 121. Ref. Centralbl. f. Bakt. Ref. Bd. 76. S. 404. — Schulte-Tigges, Dtsch. med. Wochenschr. 1920. S. 1225. Schumacher-Liese, Ztschr. f. Hyg. Bd. 106. — Spreitzer, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 86. — Tribondeau, Compt. rend. Soc. d. Biol. T. 80. S. 780; Ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 69. S. 387. — Ulrichs, Dtsch. med. Wochenschr. 1919. S. 648. — Vogelbach, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 83. S. 9. — Voigt, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 85. S. 121. — Weitzmann, Diss. Dresden-Leipzig. 1922; Ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 76. S. 404. — Zimmermann, Dtsch. med. Wochenschr. 1924. S. 14.

Nachdruck verboten.

Streptokokkenbefunde bei Zahnerkrankungen in Beziehung zur Lehre von der oralen Sepsis.

[Aus dem Zahnärztlichen Institut (Direktor: Professor Dr. med. Fr. Proell) und dem Hygiene-Institut (Direktor: Professor Dr. med. et phil. E. G. Dresel) der Universität Greifswald.]

Von **Fr. Proell** und **O. Stickl** (Oberassistent am Hygiene-Institut).

Die Bakteriologie der Zahnerkrankungen, insbesondere die Frage nach der Bedeutung einer Infektion der Zähne oder ihrer Umgebung für den menschlichen Gesamtorganismus hat in den letzten Jahren durch zahlreiche Autoren eine rege Bearbeitung erfahren. Insbesondere waren es die überraschenden Untersuchungsergebnisse und die Arbeitshypothesen Rosenows und seiner Mitarbeiter, die in gleicher Weise das Interesse des Klinikers und des Bakteriologen für die dentalen fokalen Infektionen erregten. Die bisherigen, zum Teil sich widersprechenden Forschungsergebnisse konnten noch zu keiner einheitlichen Auffassung dieses Problems führen. Einer zu großen Ueberschätzung der dentalen fokalen Infektion steht andererseits eine zu weitgehende Gering-schätzung oder völlige Außerachtlassung gegenüber. Das Problem der dentalen fokalen Infektion und ihrer Beziehung zu allgemeinen Gesundheitsstörungen kann seiner Lösung nur näher gebracht werden durch noch eingehendere bakteriologische Vorarbeiten und eine sorgfältige, nichts präjudizierende Zusammenarbeit des Klinikers, Zahnarztes, Bakteriologen und Pathologen.

Die nachstehenden Untersuchungen, die im hiesigen Zahnärztlichen und Hygiene-Institut gemeinsam ausgeführt wurden, sollen in erster Linie eine kritische Ueberprüfung der bei uns gegebenen bakteriologischen Voraussetzungen für das Zustandekommen einer odontogenen Sepsis sein.

Das zur Untersuchung gelangte Material wurde in der Zahnklinik entnommen nach gemeinsamer Beratung über die nach den jeweils vorliegenden anatomischen und chirurgischen Verhältnissen bestmögliche Art und Weise eines sterilen Vorgehens und dem Hygiene-Institut zur weiteren Untersuchung übergeben. Im einzelnen gestaltete sich die Technik der Materialentnahme und der bakteriologischen Bearbeitung folgendermaßen: Das Operationsfeld wurde so weit als notwendig zum Schutze gegen Verunreinigung mit Speichel nach den üblichen Regeln der zahnärztlich-chirurgischen Asepsis abgedeckt.

Das Zahnfleisch und der freiliegende Teil des Zahnes wurden zunächst mit 60proz. Alkohol behandelt und hierauf nach eventueller Abtupfung des überschüssigen Alkohols mit steriler Watte mit 2proz. Jodtinktur bestrichen. Der Sterilität der Instrumente, des Tupfermaterials und der Tampons wurde besondere Aufmerksamkeit geschenkt. In einigen Fällen, in denen sich das Verbandmaterial als nicht steril erwies, wurden die Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung des betreffenden Zahnmaterials nicht verwertet. Die Entnahme von Sekret aus den Zahnfleischtaschen oder der Pulpahöhle erfolgte mit sterilen Kapillaren. Die extrahierten Zähne, insbesondere die Wurzelspitzen mit und ohne Granulome wurden in absoluten Alkohol getaucht und nach Abtupfung des überflüssigen Alkohols kurz abgebrannt. Rosenow glüht die zur bakteriologischen Untersuchung bestimmten Granulome kurz mit einem Spatel oberflächlich ab und entnimmt mit einer Kapillare durch die verschorfte Granulomhaut hindurchgehend Material aus dem Innern des Granuloms. Diese Technik setzt aber größere und derbere Gebilde von Granulomen voraus, wie sie bei unseren derzeitigen Patienten fast nie beobachtet wurden. Sowohl das Abbrennen mit Alkohol als die Verschorfung mit dem Glüheisen schließt die Gefahr einer Keimschädigung durch Hitzeeinwirkung in sich. Wir haben es deshalb später vorgezogen, die Wurzelspitzen mit den Granulomen in 60proz. Alkohol zu tauchen und den Alkohol verdunsten zu lassen.

Das mit der Kapillare entnommene Untersuchungsmaterial wurde in Kalbshirn-Marmor-Nährbouillon (pH 7,4) gebracht und sofort bei $37^{\circ}C$ bebrütet. Später wurde anstelle dieser Gehirn-Marmor-Nährbouillon eine Eier-Marmorbouillon verwendet, da vergleichende Untersuchungen ergaben, daß die Eierbouillon den Streptokokken ebenso gute Wachstumsbedingungen bot wie die Gehirnbouillon. Die von Rosenow angewendeten Spezialnährböden konnten, da sie zu spät in unseren Besitz gelangten, für diese Untersuchungen nicht mehr benutzt werden. Nach 24stünd. Bebrütung bei 37° wurden aus der Bouillon Blutagarstrichkulturen angelegt.

Die Wurzelspitzen wurden in mit physiologischer Kochsalzlösung und sterilem Sand beschickten Röhrchen $\frac{1}{2}$ Std. lang im Schüttelapparat geschüttelt; hierauf wurden aus dem Sandröhrchen ebenfalls Blutagarstrichkulturen angelegt.

Zur näheren Bestimmung wurden 132 Streptokokkenstämme auf den entsprechenden Differentialnährböden auf ihre biologischen Eigenschaften untersucht. Die Differentialnährböden wurden stets von einer 24 Std. alten Blutagarstrichkultur beimpft. Eine Klassifizierung der Streptokokken nach ihrem morphologischen Aussehen hielten wir nicht für angezeigt, da wir mit E. Wirth und Schottmüller durchaus die Ansicht teilen, „daß eine Artunterscheidung der verschiedenen Streptokokkenarten im allgemeinen und insbesondere der menschenpathogenen morphologisch unmöglich ist.“ Bei der Auswahl und Herstellung der Differentialnährböden folgten wir den Angaben und Vorschriften von E. Wirth.

Unter den auf Differentialnährböden untersuchten Streptokokkenstämmen haben wir hinsichtlich ihres biologischen Verhaltens 10 verschiedene Gruppen unterschieden. Im einzelnen waren die verschiedenen Gruppen folgendermaßen charakterisiert:

Gruppe I. Blutagar und Blutbouillon:

Arabinosemilch:

Lackmusmilch:

Lackmusmolke:

Malachitgrünmilch:

Keine Hämolyse.

Gerinnung (nach 2—4 Tagen).

Gerinnung; nach 24—48 Stunden weiß; dann oben beginnende und nach unten zu fortschreitende mehr oder weniger starke Rötung.

Rotfärbung.

Grünfärbung nach 4—7 Tagen.

		Neutralrotmilch:	Gerinnung, mehr oder weniger deutlich Reduktion.
Gruppe II.	Malachitgrünmilch:		unverändert, sonst wie Gruppe I.
Gruppe III.	Malachitgrünmilch:		unverändert.
	Neutralrotmilch:		Gerinnung, aber keine Reduktion, sonst wie Gruppe I.
Gruppe IV.	Neutralrotmilch:		keine Gerinnung, keine Reduktion, sonst wie Gruppe I.
Gruppe V.	Malachitgrünmilch:		unverändert.
	Lackmusmilch:		unverändert, sonst wie Gruppe I.
Gruppe VI.	Arabinosemilch:		unverändert.
	Malachitgrünmilch:		unverändert, sonst wie Gruppe I.
Gruppe VII.	Lackmusmilch:		unverändert, sonst wie Gruppe I.
Gruppe VIII.	Arabinosemilch:		unverändert, sonst wie Gruppe I.
Gruppe IX.	Lackmusmolke:		unverändert, sonst wie Gruppe I.
Gruppe X.	<i>Streptococcus pyogenes haemolyticus</i> .		

Die Gruppe I, welche, wie später dargelegt werden soll, die meisten Streptokokkenstämme umfaßt, zeigt das Verhalten des *Streptococcus lactis* Heim (*Streptococcus acidi lactici*, *Streptococcus lacticus* Kruse). Bei den Gruppen II—IX ist es nicht möglich, sie irgendeiner der von Wirth oder von anderen Autoren beschriebenen Streptokokkenarten zuzurechnen. Innerhalb der einzelnen Gruppen bestanden wieder zahlreiche Verschiedenheiten, je nach der Zeitdauer bis zum Eintritt und nach der mehr oder weniger starken Intensität der Veränderung des Differentialnährbodens. Da es uns lediglich darauf ankam, das wesentliche Zustandsbild der Streptokokken nach ihren biologischen Eigenschaften festzulegen, glaubten wir im Interesse einer besseren Uebersicht diese kleinen und geringfügigen Varianten unberücksichtigt lassen zu dürfen. Eine ausführliche Darlegung aller dieser Abweichungen von dem oben geschilderten Verhalten der einzelnen Gruppen würde zur Aufstellung von etwa 60 Untergruppen führen, was — ohne wesentlich Neues zu bringen — den Ueberblick über das an und für sich abwechslungsreiche Bild dieser sich sehr nahe stehenden Streptokokkenstämme nur verwirren würde. Zum Teil dürften diese kleinen Unterschiede wohl darauf beruhen, daß trotz der sorgfältigen Herstellung der einzelnen Differentialnährböden die verschiedenen Kochungen nicht immer vollständig gleichartig sind.

Stamm 308, der einzige beobachtete Vertreter der Gruppe VI, zeigte morphologisch große Aehnlichkeit mit dem *Streptococcus longissimus*. Die Streptokokken bildeten lange, durch das ganze Gesichtsfeld gehende Ketten, röteten aber die Lackmusmolke leicht, bildeten auf der Blutagarplatte ziemlich große, üppige, wasserklare Kolonien und ließen den Nährboden unverändert (keine Grünfärbung). Gruppe X umfaßt die wenigen beobachteten hämolysierenden Pyogenesstämme.

Das wesentlichste und auffallendste Ergebnis bei der Differentialdiagnostischen Untersuchung ist, daß unter 307 Streptokokkenbefunden nur 6mal ein *Streptococcus haemolyticus pyogenes* beobachtet wurde. Sämtliche Haemolyticus-Stämme zeichneten sich durch eine sehr geringe Hämolysierfähigkeit aus. Vier von diesen Stämmen wurden bei einem an Muskelrheumatismus erkrankten Patienten aus dem Sekret der Zahnfleischtaschen gezüchtet, ein weiterer hämolysierender Stamm wurde bei einem klinisch gesunden Manne mit einer chronischen Pulpo-Periodontitis aus der Wurzelspitze gewonnen; der letzte hämolysierende Stamm wurde in einer Wurzelspitze mit vereitertem Granulom bei einem ebenfalls klinisch gesunden Manne gefunden.

In allen übrigen Fällen konnten niemals jene Streptokokkenarten gefunden werden, denen wir im allgemeinen besondere menschenpathogene Eigenschaften zuschreiben: *Streptococcus haemolyticus pyogenes*, *Streptococcus*

viridans, *Pneumococcus* und *Streptococcus mucosus*. Hierin unterscheiden sich die Ergebnisse unserer Untersuchungen wesentlich von denen Rosenows und anderer Autoren, die über häufige Befunde von hämolysierenden, insbesondere von Viridansstreptokokken und Pneumokokken berichten. Pesch fand in Köln bei der Untersuchung von 120 Granulomen neben 12 hämolysierenden Streptokokkenstämmen insgesamt 135 grünwachsende Stämme. Auch Pesch berichtet über das Vorkommen von Streptokokkenstämmen, die sich nicht ohne weiteres in eine der bisher bekannten Streptokokkengruppen einreihen ließen. Pesch teilte allerdings die bei seinen mehr auf allgemein-pathologische als bakteriologisch-systematische Gesichtspunkte eingestellten Untersuchungen die von ihm beobachteten Streptokokkenstämme nach ihrem morphologischen Aussehen, ihrem Wachstum in Nährbouillon und nach ihrer Kettenbildung nur in 2 Gruppen, in eine Streptokokkengruppe und eine Pneumokokkengruppe ein, so daß hieraus nicht hervorgeht, zu welchen engeren biologischen Familien von Streptokokken die von ihm beobachteten Sonderstämme und seine grünwachsenden Stämme in näherer Beziehung standen.

Sämtliche von uns gefundenen Streptokokkenstämme entsprechen mit den vorher erwähnten 6 Ausnahmen entweder dem *Streptococcus lactis* oder stehen ihm oder dem *Streptococcus anhaemolyticus* wenigstens sehr nahe. Wie Wirth hervorhebt, „zeigen die einzelnen Stämme des Typus *lactis* a unter sich mancherlei Verschiedenheiten; vermutlich dürfte ein eingehendes Studium dieser Streptokokkengruppe noch zur Aufstellung einzelner Unterarten führen“. Die Frage, ob die von uns gefundenen Streptokokkenstämme selbstständige Untergruppen des *Streptococcus lactis* darstellen oder als dessen reversible Variationsformen aufzufassen sind, können wir auf Grund der bisherigen Untersuchungen nicht entscheiden.

Das zur Untersuchung gelangte Material wurde zum Teil nach dem pathologisch-anatomischen zahnärztlichen Befund eingeteilt (Serie I: Wurzelspitzen mit Granulomen; Serie II: Wurzelspitzen ohne Granulome; Serie III: Alveolarpyorrhoe). Ferner stellten wir jene „besonderen Fälle“ (Serie IV) zusammen, bei denen nach der genauest vorgenommenen zahnärztlichen Untersuchung, nach der Anamnese und nach dem allgemeinen Krankheitsprozesse die Möglichkeit eines Zusammenhanges zwischen der dentalen fokalen Infektion und der allgemeinen Gesundheitsstörung in Erwägung gezogen werden mußte. Leider ließen sich in den allermeisten Fällen keine spezialärztlichen Untersuchungen ermöglichen, so daß die Vermutung einer „Oralsepsis“ lediglich als Verdachtsmoment zu bewerten ist. Eine Ergänzungsgruppe (Serie V) umfaßt alle jene Fälle, die sich in die vorhergehenden Gruppen nicht einreihen ließen. Außerdem wurden von Zähnen mehrerer Patienten Serienschritte bakteriologisch verarbeitet (Serie VI).

Die Serie der „besonderen Fälle“ umfaßt 25 Patienten, von denen, abgesehen von den Zahnerkrankungen, 11 an Polyarthrits infectiosa acuta oder chronisch entzündlichen Gelenkerkrankungen, 3 an Nephritis, 3 an allgemeiner schleichender Sepsis, 2 an Iritis, je einer an Chorioiditis, sympathischer Ophthalmie, chronischer Konjunktivitis und Osteomyelitis erkrankt waren; 2 weitere Fälle betrafen Ektropium und Epulis. Das zur Untersuchung gelangte Material entstammte je nach der Zahnerkrankung und dem operativen zahnärztlichen Vorgehen teils dem Sekret der Zahnfleischtaschen, kariösem Zahnmateriale, Wurzelspitzen, Granulomen, Dentin aus verschiedenen Schichten der Zähne und Sekret aus der Pulpahöhle.

Von den 25 Patienten wurden 153 Zahnmaterialproben untersucht. 33mal war das Material steril, in 120 Fällen züchteten wir Streptokokken. Von diesen

120 Streptokokkenstämmen wurden 40 auf den oben angegebenen Differentialnährböden näher untersucht. Diese Untersuchung ergab, daß

32 Streptokokkenstämmen der Gruppe				I
4	"	"	"	II
1	"	"	"	III
1	"	"	"	VIII und
2	"	"	"	IX angehörten.

Bei den 39 bakteriologischen Untersuchungen von Wurzelspitzen mit Granulomen (Serie I) wurden 23mal Streptokokken gefunden; in 16 Fällen war das Material steril. Im Vergleich zu den Untersuchungsergebnissen anderer Autoren ist diese relative Häufigkeit von Sterilität auffallend. Es ist durchaus möglich, daß durch das, wenn auch vorsichtige kurze Abbrennen der in absoluten Alkohol getauchten Wurzelspitzen in manchen Fällen die Granulome und die in ihnen beherbergten Mikroorganismen zerstört wurden, zumal die Granulome in den meisten Fällen nur äußerst kleine, zarte und schleimähnliche Gebilde darstellten. Von den 23 gezüchteten Streptokokkenstämmen wurden 14 auf Differentialnährböden näher untersucht, 12 Stämme gehörten wieder der Gruppe I an, 1 Stamm der Gruppe II und 1 Stamm der Gruppe X (*Streptococcus haemolyticus pyogenes*).

Von 51 Patienten gelangten Wurzelspitzen ohne Granulome (Serie II) zur Untersuchung. Es handelt sich um Fälle von teils akuter, teils chronischer Pulpo-Periodontitis, Perizementitis, Periostitis, teils um kariöse Zähne und Wurzelreste. Von 88 Untersuchungsproben waren 23 steril, bei 59 wurden Streptokokken gefunden, darunter befand sich nur ein einziger *Haemolyticus*-Stamm; von den übrigen 18, auf Differentialnährböden näher untersuchten Stämmen entsprachen 17 der Gruppe I, ein Stamm der Gruppe VI.

Bei 10 Patienten wurde eine Alveolarpyorrhoe diagnostiziert (Serie III). Bei dem untersuchten Material handelt es sich meistens um Sekret aus der Zahnfleischtasche und um Bohrstaub. Von 58 eingesandten Untersuchungsproben waren 9 steril, in 47 wurden Streptokokken gefunden. Von den 25 differential-diagnostisch untersuchten Stämmen gehörten 20 der Gruppe I, 2 der Gruppe II, 1 der Gruppe III, 1 der Gruppe V und 1 der Gruppe VIII an.

Die Ergänzungsgruppe (Serie V) umfaßt 32 Patienten, von denen 74 Zahnmaterialproben zur Untersuchung eingesandt wurden. 12mal war das

Tabelle I.

Nr.	Serie	Zahl der Patienten	Zahl der Untersuchungen	Streptokokkenbefund			steril	Zahl der Gruppen	Streptokokkengruppen									
				rein	in Mischkulturen	zusammen			I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
I	Wurzelspitzen mit Granulomen	26	39	18	5	23	16	14	12	1	1
II	Wurzelspitzen ohne Granulome	51	88	47	12	59	23	19	17	.	.	.	1	1
III	Alveolarpyorrhoe	10	58	41	6	47	9	25	20	2	1	.	1	.	.	1	.	.
IV	Besondere Fälle	25	153	96	24	120	33	40	32	4	1	1	2	.
V	Ergänzungen	32	74	46	13	59	12	29	23	1	1	.	.	4
VI	Sektionschnitte	10	94	57	4	61	25	33	28	1	.	1	.	1	1	1	.	.

Material steril, in 59 Untersuchungsproben wurden Streptokokken gefunden; von 29 auf Differentialnährböden geprüften Stämmen gehörten 23 der Gruppe I, je einer der Gruppe II und VII an, 4 der Gruppe X (*Streptococcus haemolyticus pyogenes*).

Die eben besprochenen Befunde sind in vorstehender Uebersichtstabelle (S. 16) zusammengefaßt.

Um Mißverständnissen bezüglich der Gesamtzahl der Untersuchungen vorzubeugen, sei bemerkt, daß in die Serien I, II und III mehrere Patienten aus der Serie IV übernommen wurden. Es handelte sich im ganzen um 412 Untersuchungen; in 307 Untersuchungsproben wurden Streptokokken gefunden; 132 Streptokokkenstämme wurden auf Differentialnährböden näher bestimmt.

Aus oben stehender Zusammenstellung geht hervor, daß in jeder der 5 oben besprochenen Serien in der Mehrzahl der Fälle die Streptokokken in Reinkultur gewonnen wurden. Bei den Mischkulturen handelt es sich um eine Vergesellschaftung von Streptokokken mit Staphylokokken, gramnegativen Kokken, grampositiven und gramnegativen Stäbchen, wie wir sie unter der Mundflora anzutreffen gewohnt sind. Dieses Ergebnis darf bei Berücksichtigung der in der Mundhöhle vorliegenden aseptischen Verhältnisse wohl als eine weit gehende Gewähr für die sterile Entnahme und des sterilen operativen Vorgehens angesehen werden. Dabei muß noch berücksichtigt werden, daß es sich vielfach um sehr defekte Zähne handelte, bei denen ohne weiteres zu erwarten war, daß außer Streptokokken auch andere Keime der Mundflora in das Zahninnere vorgedrungen sind.

Die auf Differentialnährböden untersuchten Streptokokkenstämme gehören in der überwiegenden Mehrzahl der Gruppe I (*Streptococcus lactis*) an. Die Sonderstämme der Gruppen II—IX wurden bei ganz verschiedenartigen Zahnerkrankungen sowohl klinisch gesunder wie auch kranker Personen und in verschiedenen Zahnschichten und Tiefen gefunden, so daß sich keine gesetzmäßige Beziehung zwischen dem Auftreten dieser Sondertypen und ihrem Fundorte ergab. Zum näheren Studium der Frage, ob zwischen dem Auftreten der Sondertypen und dem Entnahmeort nähere Beziehungen bestehen, wurde von 9 klinisch gesunden und je einem an Trachom und Chorioiditis erkrankten Patienten aus einem Zahn möglichst viel Material untersucht. Zu diesem Zwecke wurden Sektionsschnitte angelegt (Serie VI) und aus verschiedenen Schichten und Tiefen des Zahnes, sowohl aus dem zerstörten, entzündeten oder scheinbar gesunden Gewebe des Zahnes und seiner Umgebung Material entnommen. Die Sektionsschnitte wurden anfangs mit einer elektrisch betriebenen Kreissäge angefertigt, später wurden die Zähne mit sterilen Instrumenten gebrochen; letzteres Verfahren schien ein steriles Vorgehen leichter zu ermöglichen als die Anwendung der Säge.

Von 94 Materialproben waren 25 steril; aus 61 Proben wurden Streptokokken gezüchtet, und zwar 57mal als Reinkultur, 4mal in Mischkulturen mit Staphylokokken. Von 33 auf Differentialnährböden näher bestimmten Streptokokkenstämmen dieser Serie gehörten 28 der Gruppe I, nur je 1 Stamm den Gruppen II, IV, VI, VII und VIII an.

Die Stämme der Gruppe I entstammten den verschiedenartigsten Teilen und Tiefen des Zahnes.

Die Streptokokken der Gruppe II wurden aus dem Sekret des Wurzelkanals (Diagnose: r. u. 6. chronische Pulpo-Periodontitis),

die Streptokokken der Gruppe IV wurden aus dem Dentin vom oberen Teil des eröffneten Wurzelkanals (Diagnose: Karies),

die Streptokokken der Gruppe VI wurden aus einer Wurzelspitze (Diagnose: l. u. 6. Pulpo-Periodontitis; Pulpa lebt),

die Streptokokken der Gruppe VII wurden aus dem Dentin über der Wurzelspitze (Diagnose: l. o. 6. Pulpo-Periodontitis; Pulpa lebt),

die Streptokokken der Gruppe VIII wurden aus dem Dentin des Mittelstücks der Zahnwurzel (Diagnose: akute Pulpitis) gezüchtet. Auch diese Befunde lassen keine Schlüsse auf bestehende Wechselbeziehungen zwischen dem Fundorte und dem biologischen Verhalten der Streptokokkenstämme zu. Dagegen scheinen uns diese Untersuchungsergebnisse aus den Sektionsschnitten insofern bemerkenswert zu sein, als sie zeigen, daß auch bei der eingehenderen Durchsuchung des einzelnen Zahnes keine hämolyzierenden oder Viridans-Streptokokken gefunden wurden.

Ob die dem *Streptococcus lactis* entsprechenden oder nahestehenden Mikroorganismen als die Erreger der Zahnerkrankungen, wie einer Pulpo-Periodontitis anzusehen sind oder ob sie als Saprophyten von der Mundhöhle aus durch schon kariöse Stellen in das Innere des Zahnes vorgedrungen sind, ließ sich bisher nicht entscheiden.

Es erhebt sich nun die Frage, in wieweit die Ergebnisse dieser bakteriologischen Untersuchungen und der noch zu besprechenden Tierversuche für das Problem der Wechselbeziehungen zwischen einer dentalen fokalen Infektion und einer Allgemeinerkrankung und für die von Rosenow aufgestellte Theorie von dem elektiven Lokalisationsvermögen der Zahnstreptokokken herangezogen werden können.

Das überraschende Ergebnis, daß unter 307 Streptokokkenstämmen nur 6mal ein *Streptococcus haemolyticus pyogenes*, niemals ein *Streptococcus viridans* gefunden wurde, läßt es von vornherein nicht wahrscheinlich erscheinen, daß unter den bei uns gegebenen Verhältnissen die dentalen fokalen Infektionen eine große Rolle spielen für das Zustandekommen allgemeiner Gesundheitsstörungen, wie sie unter dem von W. Hunter geschaffenen und neuerdings von E. Rosenow sehr erweiterten Begriff der „Oralsepsis“ zusammengefaßt werden. Es sei noch besonders darauf hingewiesen, daß von den 6 beobachteten *Haemolyticus*-Stämmen 4 nicht aus dem Inneren des Zahnes oder aus der Tiefe des Wurzelbettes stammten, sondern aus oberflächlichen Zahnfleischtaschen gezüchtet wurden. Viele Menschen beherbergen in ihrer Mundhöhle pathogene Mikroorganismen, wie hämolyzierende Streptokokken, die wahrscheinlich sehr oft durch kleine Schleimhautverletzungen in den allgemeinen Saftstrom übergehen, ohne daß es dadurch zu erheblichen oder auch nur nachweisbaren Gesundheitsstörungen kommt.

Der *Streptococcus lactis* Heim ist für gewöhnlich nicht pathogen. Es mußte jedoch mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß die dem *Streptococcus lactis* entsprechenden oder ihm nahestehenden Streptokokkenarten in der ihnen normalerweise nicht zukommenden Umgebung in der Tiefe des Zahnes sich so verändern können, daß sie nicht nur für die befallenen Zahn- gewebe, sondern auch für den Gesamtorganismus pathogene Bedeutung erlangen. Zur Untersuchung dieser Frage wurden 71 Kaninchen mit diesen aus dem verschiedenartigstem Zahnmaterial gewonnenen Streptokokkenstämmen infiziert. Den Tieren wurden 2—3 ccm einer 24 Std. alten Bouillonkultur intravenös injiziert. Wenn solchen künstlichen, massiven Infektionen des Kaninchens auch keine in jeder Beziehung, namentlich für menschliche Verhältnisse überzeugende Beweiskraft zugesprochen werden kann, so können sie doch in einem gewissen Grade einen Maßstab für die Pathogenität und die Virulenz der Mikroorganismen geben. Die Ergebnisse dieser Tierversuche sind in nachstehender Tabelle II (S. 19) zusammengefaßt.

Aus dieser Zusammenstellung geht hervor, daß von den 71 Kaninchen nur 12 Tiere gestorben sind, bei denen aus den inneren Organen oder aus dem

Tabelle II.

Unter- suchungs- serien	Zum Tierversuch verwendete Streptokokken			Gesamt- zahl der Tiere	Herzpunktion		Gestorben		Getötet		Lebende Tiere
	Gruppe	Anzahl der Stämme	Anzahl der Tiere		Strepto- kokken +	Strepto- kokken —	Strepto- kokken +	Strepto- kokken —	Strepto- kokken +	Strepto- kokken —	
Wurzel- itzen ohne ranulome	I	4	11	15	2	1	—	—	—	—	11
	ohne Gruppen- bestimmung	2	4	.	—	—	2	1	—	—	1
Besondere Fälle	I	1	2	20	—	—	—	—	—	1	1
	IX	1	3	.	1	—	—	—	—	.	3
	ohne Gruppen- bestimmung	5	15	.	1	—	2	3	—	3	7
Sektions- schnitte	I	3	9	12	1	1	5	—	—	—	4
	IV	1	3	.	.	1	—	1	.	1	1
Alveolar- pyorrhoe	I	2	2	4	—	—	—	—	—	—	2
	II	2	2	.	—	—	—	—	—	—	2
Gän- zungen	I	6	17	20	1	3	3	1	—	1	12
	II	1	3	.	—	1	—	—	—	—	3

Blute wieder Streptokokken gezüchtet werden konnten. Die Sektion ergab bei diesen Tieren das Bild einer allgemeinen schweren Sepsis. Bei 2 Tieren bestand eine schwere Endokarditis mit blumenkohlartigen Auflagerungen auf der Mitrals. Bei den aus dem Sektionsmaterial gezüchteten Mikroorganismen handelte es sich um nicht hämolysierende, nicht grün wachsende, sondern in die Gruppe des *Streptococcus lactis* gehörende Streptokokken. Weitere 6 Tiere sind viele Wochen nach der Infektion gestorben. Die bakteriologische Untersuchung und der pathologisch-anatomische Befund gaben keinen Anhaltspunkt für einen unmittelbaren Zusammenhang zwischen der früheren Infektion und der Todesursache. Die Tiere sind zum Teil einer Echinokokkeninfektion, zum Teil einer Pneumonie und Enteritis erlegen. Streptokokken konnten weder aus dem Blute, noch aus den inneren Organen gezüchtet werden.

Das Zustandekommen einer odontogenen Allgemeininfektion hängt, abgesehen von der individuell sehr schwankenden und nicht direkt meßbaren Krankheitsbereitschaft des Organismus, von zwei Faktoren ab: einmal von der Pathogenität und Virulenz der in dem dentalen Infektionsherd vorhandenen Mikroorganismen, und von der Möglichkeit ihres Eindringens in den Gesamtorganismus.

Das Ergebnis der oben angeführten Tierversuche spricht bei Berücksichtigung der kolossalen Infektionsdosis nicht für eine gesteigerte Virulenz und Pathogenität der injizierten Mikroorganismen. 2 von den 12 an einer allgemeinen Sepsis verendeten Tiere wurden — worauf später noch eingegangen werden soll — nicht mit Reinkulturen von Streptokokken, sondern mit Mischkulturen von Streptokokken mit Staphylokokken, grampositiven und gramnegativen Stäbchen, worin allerdings die Streptokokken in der überwiegenden Mehrzahl waren, infiziert.

Zur Infektion wurden Vertreter von mehreren der früher beschriebenen Streptokokkengruppen verwendet. Die nach der Gruppenzugehörigkeit der

Streptokokkenstämme geordnete Zusammenstellung der Tierversuche ist in nachstehender Tabelle III niedergelegt:

Tabelle III.

Streptokokkengruppe	Anzahl der infizierten Kaninchen	gestorben		getötet		lebend
		Streptok. +	Streptok. —	Streptok. +	Streptok. —	
I	41	8	1	0	2	30
II	5	0	0	0	0	5
IV	3	0	1	0	1	1
IX	3	0	0	0	0	3
Typ nicht bestimmt	19	4	4	0	3	8
	71	12	6	0	6	47

Aus diesen Ergebnissen läßt sich kein Schluß ziehen auf beträchtliche Unterschiede in der Virulenz der einzelnen Streptokokkengruppen.

Ueber die Möglichkeit des Eindringens der Zahnstreptokokken in die Blutbahn und die inneren Organe gehen die Ansichten der Autoren sehr auseinander. Nach Schottmüller sind die Infektionen in und an den Zähnen — Pulpitis, Granulome, apikale und paradentale Eiterungen — als „lokale Infektionen und wohl als Eingangspforten für septische Krankheitserreger zu werten, so gut wie nie als Sepsisherde“. Was die chronischen Infektionen der toten Pulpa der Wurzelspitzen und die Granulome betrifft, so ist Schottmüller im Gegensatz zu E. Rosenow der Meinung, „daß, wenn überhaupt von diesen abgeschlossenen pathologischen Prozessen noch Keime in den Saftstrom eindringen, letztere, weil zu gering an Zahl, in der Regel keine Gesundheitsschädigung veranlassen“. Diese Frage bedarf zu ihrer endgültigen Klärung noch weiterer Beobachtung und Erforschung. Auf jeden Fall aber steht die Einschwemmung von Krankheitskeimen aus einem dentalen Infektionsherd in keinem Vergleich zu der massiven Infektionsdosis, wie sie in unseren Tierversuchen absichtlich angewendet wurde. Nach dem Ausfall unserer Tierversuche ist mit allergrößter Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß die bei einer dentalen fokalen Infektion mögliche Aussaat der von uns beobachteten, dem Streptococcus lactis nahestehenden Streptokokken nicht zu einer erheblichen Gesundheitsstörung führen wird.

Daß zwischen dentaler Infektion und Erkrankung des Gesamtorganismus Beziehungen bestehen können, ist lange bekannt. Auf Grund unserer Untersuchungen glauben wir aber schließen zu müssen, daß die odontogenen Infektionen in den bei uns gegebenen Verhältnissen nicht die große Rolle spielen, wie dies namentlich von amerikanischen Untersuchern auf Grund ihrer Forschungsergebnisse für die dortigen Verhältnisse angenommen wird.

Aus der früher gegebenen Charakteristik der von uns beobachteten Streptokokkenstämme läßt sich ableiten, daß das uns zur Verfügung gestandene Untersuchungsmaterial für das Studium der vielumstrittenen Lokalisationstheorie im Sinne Rosenows nur wenig geeignet war. Trotzdem haben wir auch diesem Problem besondere Aufmerksamkeit geschenkt.

In einem Falle handelte es sich um einen an Iritis erkrankten Patienten, bei dem aus der Wurzelspitze Streptokokken der Gruppe I gezüchtet wurden. Gerade die Iritis wurde von Rosenow in den Begriff der Oralsepsis mit einbezogen. Mit diesen Streptokokken wurden 3 Kaninchen infiziert (je 3 ccm einer 24 Std. alten Bouillonkultur intravenös). 2 von diesen Tieren blieben gesund und am Leben. Das dritte Kaninchen ging innerhalb von 2 Wochen

an einer allgemeinen Sepsis zugrunde. Die Sektion ergab neben zahlreichen septischen Herden in fast allen inneren Organen auch eine Iritis des einen Auges, die durch das Entgegenkommen der Universitätsaugenklinik spezialärztlich bestätigt wurde. Das Auftreten einer Iritis in dem Krankheitsprozeß einer allgemeinen Sepsis hat aber nach unserer Ansicht keine besondere Bedeutung und ist keineswegs beweisend für ein elektives Lokalisationsvermögen der Infektionserreger. Aus dem Kammerwasser des erkrankten Auges wurden wieder Streptokokken der Gruppe I in Reinkulturen gewonnen. Mit diesem aus dem Auge gezüchteten Stamm wurden weitere 3 Kaninchen infiziert; sämtliche blieben gesund und am Leben. Eine krankhafte Veränderung der Iris trat nicht auf. Rosenow macht darauf aufmerksam, daß die elektive Lokalisation der Streptokokken nur in den ersten Tagen nach der Infektion festgestellt werden kann, da sie sonst durch die später eintretende allgemeine Sepsis verdeckt würde. In Berücksichtigung dessen wurden später mit 6 verschiedenen Stämmen je 3 Kaninchen infiziert, von denen jeweils ein Tier am 2. bis 3. Tage nach der Infektion getötet und bakteriologisch und anatomisch untersucht wurde. In zwei Fällen wurden, wie oben schon erwähnt, statt Streptokokkenreinkulturen Mischkulturen zur Infektion verwendet, um die zur Reinzüchtung erforderlichen Passagen auf künstlichen Nährböden zu vermeiden und die aus dem Zahnmaterial gewonnenen Streptokokkenstämme möglichst in ihrem ursprünglichen Zustand zu erhalten. Anstelle einer ausführlichen Darlegung der einzelnen Untersuchungen lassen sich deren Ergebnisse dahin zusammenfassen, daß sich bei den 6 am 3. Tage nach der Infektion getöteten Tieren weder bakteriologisch noch makroskopisch-anatomisch ein Befallensein des homologen beim Menschen erkrankten Organes nachweisen ließ. Eine histologische Untersuchung der betreffenden Organe konnte nicht ausgeführt werden. Von den 71 Versuchstieren sind 12 gestorben unter dem Bilde einer allgemeinen Sepsis, in deren Krankheitsprozeß in 3 Fällen das beim Menschen erkrankte homologe Organ inbegriffen war. (Einmal Iritis, zweimal Nephritis).

Die von Rosenow auf Grund seiner langjährigen, mit allen modernen Hilfsmitteln ausgestatteten Untersuchungen und seiner überaus zahlreichen Tierversuche begründete Theorie von dem elektiven Lokalisationsvermögen der aus dentalen Infektionsherden gewonnenen Streptokokken stellt in der Biologie dieser Mikroorganismen wie in der allgemeinen menschlichen Pathologie ein so merkwürdiges und wichtiges Problem dar, daß seine sorgfältigste Untersuchung an einem geeigneteren und umfangreicheren Material, als es das unsrige war, erforderlich ist. Wir haben jedenfalls aus unseren Untersuchungen keinen Anhaltspunkt für eine organotrope Tendenz unserer im Tierversuch verwendeten Streptokokkenstämme gewinnen können. Dagegen machte Stein unlängst darauf aufmerksam, daß seine ausgedehnten, aber noch nicht abgeschlossenen Versuche ihm Anhaltspunkte dafür gaben, „daß in der Lehre Rosenows von der elektiven Lokalisation der Streptokokken doch etwas mehr Wahrheit steckt, als man allgemein geneigt ist, anzunehmen“. In ähnlicher Weise äußerten sich Adloff und Precht. Eine eingehendere Erörterung der klinischen Fragen wird später an anderer Stelle von Fr. Proell erfolgen.

Literaturangaben.

- 1) Hunter, W., The role of sepsis and of antiseptis in medicine. (Lancet. 1911. Vol. 1). —
- 2) Pesch, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 104. S. 228. — 3) Rosenow, E. C., Vierteljahresschr. f. Zahnheilk. Bd. 40. 1924. S. 350, dort weitere Literaturangaben. — 4) Schottmüller, Münch. med. Wochenschr. Jahrg. 74. 1927. S. 1527. — 5) Stein, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 104. 1927. S. 235. — 6) Wirth, E., Ebenda. Bd. 99. 1926. S. 266. — 7) Adloff, Zahnärztl. Rdsch. 1928. S. 839. — 8) Precht, Deutsch. med. Wochenschr. 1927. S. 1131.

Nachdruck verboten.

Ein Verfahren der Virulenzbestimmung von Tuberkelbazillen für die Laboratoriumspraxis¹⁾.

(Aus dem Institut Robert Koch in Berlin).

Von **B. Lange** und **K. Lydtin**.

Eine Virulenzprüfung pathogener Mikroorganismen lediglich durch Bestimmung der kleinsten im Tierversuch noch infizierenden Menge Kultur- oder Organverreibung ist insofern nicht einwandfrei, als die Anzahl lebender Keime sowohl in künstlichen Kulturen noch mehr natürlich in tierischen Organen manchmal recht erheblichen Schwankungen unterliegt. Es empfiehlt sich deshalb, bei Virulenzprüfungen stets auszugehen von der Zählung der zur Verimpfung gelangenden lebenden Mikroorganismen nach dem Kulturverfahren. Auch für Tuberkelbazillen kann man nun, wie ich zeigen konnte²⁾, eine Virulenzbestimmung in der Weise vornehmen, daß die Anzahl der zur Verimpfung gelangenden lebenden Tuberkelbazillen durch das Kulturverfahren kontrolliert wird. Die im letzten Jahre gemeinsam mit Herrn Dr. Lydtin fortgeführten Untersuchungen sind noch nicht abgeschlossen, ich möchte hier nur ganz kurz die Resultate besprechen.

Wir gehen jetzt so vor, daß wir abgestufte kleinste Mengen einer bestimmten Bazillenaufschwemmung teilweise auf Eierserumröhrchen, teilweise intrakutan auf Meerschweinchen verimpfen. Nach 3—4 Wochen wird die Anzahl der auf den Röhrchen gewachsenen Kolonien festgestellt (Demonstration). Bei den Tieren wird zunächst genau geachtet auf den Zeitpunkt des Auftretens von Primäraffekt und Schwellung der regionären Lymphknoten, dann klinisch der weitere Verlauf kontrolliert. 3 Monate nach der Infektion werden sämtliche Tiere getötet. Bei dem Sektionsbefund berücksichtigen wir besonders den Umfang der hämatogenen Ausbreitung und den Grad der Verkäsung in den Lymphknoten. Die Beurteilung des Verlaufs der Tuberkulose bei den mit gleichen Bazillenmengen der verschiedenen Stämme infizierten Meerschweinchen *intra vitam* und *post mortem* ist das Entscheidende. Die Annahme, daß Virulenzunterschiede sich bereits in Verschiedenheiten der *Dosis minima inficiens* manifestieren würden, hat sich uns nicht bestätigt. Offenbar führen bei dem für Tuberkulose so hoch empfänglichen Meerschweinchen auch nicht ganz vollvirulente Tuberkelbazillenstämme zur Infektion in aller kleinsten Mengen wohl herunter bis zu 1 Bazillus. Unter unseren 30 geprüften Stämmen haben wir nur einen einzigen gefunden, der so stark abgeschwächt war, daß kleinste Bazillenmengen, z. B. 100 Millionstel mg (nach der Kulturprüfung etwa 1—10 Bazillen) nicht mehr zu makroskopisch wahrnehmbaren spezifischen Veränderungen im Körper führen. Es ist dies ein boviner Stamm von uns als „Kopenhagen“ bezeichnet, derselbe, den Moellgaard seinerzeit in seinen Sanokrysinexperimenten an Kälbern benutzt hat (Moellgaards Stamm L.). Die Virulenz der Kultur B C G von Calmette liegt noch weit unter der Virulenz dieses Stammes. Mit dieser Kultur gelingt mit Sicherheit die Infektion überhaupt erst bei verhältnismäßig großen Dosen.

Zur Bestimmung der Typen hielten wir uns in erster Linie an die bekannten charakteristischen Unterschiede auf künstlichem Nährboden (Glycerinbouillon-

1) Vortrag in der Berliner mikrobiologischen Gesellschaft am 16. 4. 1928. (Vorgetragen von B. Lange).

2) Ztschr. f. Tuberkulose. Bd. 46. 1926. S. 455.

und Lubenau-Kultur), in zweiter Linie an den Ausfall des Kaninchenversuchs. Wir injizierten nach Oehlecker 1/100 mg Kultur intravenös. Bisher hat sich unsere auf Grund des kulturellen Verhaltens getroffene Entscheidung stets mit dem Ergebnis des Kaninchenversuchs gedeckt. Es sind jetzt im ganzen 30 Stämme von uns untersucht worden, 21 humane und 9 bovine. Der Stamm B C G ist hierbei nicht mitgerechnet. Den höchsten Grad von Meerschweinchen-virulenz wiesen 4 bovine Stämme auf, 2 von diesen waren frisch aus dem Rind gezüchtet, einer bereits längere Zeit auf künstlicher Kultur gehalten stammt von einem Fall von Pferdetuberkulose, der 4. ist ein alter Laboratoriumsstamm, vor einigen Jahren aus dem Rind gezüchtet. So schwere tuberkulöse Veränderungen, wie durch diese 4 Stämme erzeugt wurden, führte kein einziger der zahlreichen geprüften humanen Stämme herbei. Von den 21 humanen Stämmen waren auffallenderweise 17 annähernd gleich hochvirulent, und zwar unter ihnen auch sämtliche 3 zur Prüfung mit herangezogenen alten Laboratoriumsstämme. Nur 4 wiesen eine geringe Virulenzabschwächung auf. Die Herkunft dieser letzten 4 Stämme ist folgende: eine Kultur war von einem Lupusfall gewonnen, die 2. aus den Lungen eines Falles spontaner Affentuberkulose, die übrigen 2 Kulturen entstammten dem Lumbalpunktat von 2 Fällen tuberkulöser Meningitis. Ganz wesentlich stärkere Virulenzunterschiede ergaben sich bei der Prüfung der bovinen Stämme. Von den 9 geprüften Stämmen erwiesen sich 5 als mehr oder weniger stark in ihrer Virulenz abgeschwächt, 1 davon besonders erheblich. Es ist dies der schon erwähnte Stamm von Moellgaard. Vielleicht ist es kein Zufall, daß gerade die bovinen Stämme so starke Unterschiede in der Virulenz erkennen ließen. Es sei noch bemerkt, daß von den mäßig abgeschwächten 2 bovinen Stämmen einer frisch aus dem Rind gezüchtet, während der andere eine aus dem Institut Pasteur stammende ältere Laboratoriumskultur ist. In etwas stärkerem Grade waren 2 andere bovine Stämme abgeschwächt, einer von ihnen eine alte Laboratoriumskultur, vom Rind stammend, der 2. aus einem Fall von Psoasabszeß eines Kindes stammend. Der 5. am stärksten abgeschwächte Stamm Kopenhagen ist eine alte Laboratoriumskultur.

Die Methode hat sich uns gut bewährt, sie ist allerdings recht umständlich und erfordert viel Uebung. Mit Rücksicht auf die praktische Wichtigkeit der Frage schien uns eine Vereinfachung der Methode selbst auf Kosten der Genauigkeit erwünscht. Unsere Beobachtungen hatten in zahlreichen Versuchen ergeben, daß eigentlich beinahe alle Stämme bis herunter zu 100 Millionstel mg Kultur auf den Eiterröhrchen noch Wachstum erkennen ließen. Wenn man also streng darauf achtet, nur junge lebensfrische Kulturen zu benutzen, kann im allgemeinen mit einer annähernd gleichen Zahl lebender Individuen pro Gewichtseinheit der Kultur gerechnet und zur Not auf das umständliche Kulturverfahren verzichtet werden. Eine weitere Schwierigkeit, nämlich die Schwankungen der natürlichen Resistenz der Tiere, welche in unseren Versuchen stets die Einstellung einer ziemlich großen Zahl von Versuchstieren (durchschnittlich 20 Meerschweinchen für jeden Stamm) erforderlich machte, konnte vermieden werden, wenn vergleichende Impfungen an ein und demselben Tier vorgenommen wurden. Wir überzeugten uns zunächst davon, daß gleiche kleinste Mengen einer Tuberkelbazillenkultur an 4 verschiedenen Stellen der Bauchhaut eines Meerschweinchens intrakutan gespritzt, zu gleicher Zeit Primäraffekt in der Haut und Lymphdrüenschwellung auftreten lassen, dann gingen wir dazu über, 4 verschiedene Stämme, deren Virulenz uns aus dem großen Virulenzprüfungsversuch bekannt war, in einer Menge von 1/1000 mg intrakutan auf ein und dasselbe Meerschweinchen zu verimpfen. Zwei Impfstellen wurden in der Bauchhaut vorn, zwei hinten nahe dem Ansatz der Extremitäten, angelegt. In einigen Versuchen verwandten wir auch kleinere Mengen

bis herunter zu 1/1000000 mg. Wir möchten auf Grund unserer Erfahrungen die Dosis von 1/100000 mg für besonders geeignet halten.

Wir konnten nun feststellen, daß, je höher die Virulenz eines Stammes war, um so früher sich der Primäraffekt und die Schwellung der regionären Lymphdrüse entwickelte. Auch noch dann, wenn sämtliche Primärintefkte der Haut sich an den 4 Stellen bereits ausgebildet hatten, verriet sich die virulentere Kultur fast regelmäßig durch die Größe des Primärherdes und der regionären Lymphknoten, was auch bei der Sektion der Tiere zum Ausdruck kam. Allerdings finden sich die erwähnten Unterschiede nur dann deutlich, wenn größere Unterschiede der Virulenz vorliegen. Wir haben nach dieser abgekürzten Methode mehrere Versuche einer vergleichenden Virulenzprüfung ausgeführt. Als Beispiel seien 4 heute vor 14 Tagen an 4 Meerschweinchen angesetzte Versuche mitgeteilt. Sämtliche Tiere erhielten intrakutan folgende zwölftägige Glyzerinbouillonkulturen injiziert, deren Virulenz uns auf Grund der ausführlichen Prüfung bekannt war: 1) Stamm S IV, bovin, hochvirulent, 2) Stamm G. A., bovin, mittelvirulent, Stamm L (Kopenhagen) bovin, abgeschwächt virulent, Stamm B C G (Calmette) bovin in der Virulenz stark abgeschwächt.

M. 5398. Prüfungsdosis 1/10000 mg. Der Primäraffekt an der Impfstelle S IV erschien 6 Tage nach der Infektion, am nächsten Tage waren auch die zugehörigen Lymphknoten fühlbar, 9 Tage nach der Infektion zeigte sich Primäraffekt und Lymphknotenschwellung entsprechend der Impfstelle G. A., nach 2 weiteren Tagen erschien der P A Kopenhagen. Die zugehörigen Drüsen sind heute noch nicht deutlich vergrößert, ein Erfolg der Calmette-Impfung ist überhaupt noch nicht feststellbar. Nach früheren Versuchen kommt der P A nach 1/10000 mg BCG etwa am 22. Tage heraus.

M. 5399. Prüfungsdosis 1/10000 mg. Zuerst erscheint der P. A. an der Impfstelle S IV, nämlich nach 6 Tagen, nach 2 weiteren Tagen wird der zugehörige Lymphknoten fühlbar, 9 Tage nach der Infektion kommt der P A und die Lymphknotenschwellung von G A heraus, erst nach 14 Tagen der Primäraffekt vom Stamm L (Kopenhagen). Die zugehörigen Lymphknoten sind heute noch nicht vergrößert, eine Wirkung des Stammes BCG ist überhaupt noch nicht festzustellen.

M. 5394. Prüfungsdosis 1/100000 mg. Nach 8 Tagen erscheint wieder als erster der Primäraffekt S IV, gleichzeitig wird der zugehörige Lymphknoten palpabel. Nach 11 Tagen erscheint der P A., nach weiteren 2 Tagen der Lymphknoten an der Verimpfungsstelle G A. Der Primäraffekt L ist heute eben angedeutet sichtbar. Vom Stamm BCG. noch keine Spur der Wirkung.

M. 5397. Prüfungsdosis 1/100000 mg. Nach 8 Tagen wird Primäraffekt und Lymphknoten S IV erkennbar, nach 11 Tagen der P A von der Impfstelle G A., nach 13 Tagen der P A der Impfstelle L. Die zugehörigen Lymphknoten sind heute noch nicht sicher erkrankt. Von der Kultur BCG ist noch nichts zu sehen.

(Demonstration der Tiere).

Diese und unsere früheren Versuche — es wurden dabei teils bovine Stämme, teils humane miteinander verglichen — sind mit Kulturen bekannter Virulenz angestellt.

Es muß auf diesem Wege ohne Zweifel auch möglich sein, Tuberkelbazillensämme unbekannter Virulenz mit Stämmen bekannter Virulenz, z. B. einem Stamm maximaler, und einem weiteren Stamm mittlerer Virulenz zu vergleichen und aus diesem Vergleich über die Virulenz des zu untersuchenden Stammes ein Urteil abzugeben. Mindestens kann so eine stärkere Abschwächung der Virulenz in verhältnismäßig kurzer Zeit ermittelt werden. Vielleicht würde es sich empfehlen, zu derartigen Prüfungen im Laboratorium Standardstämme heranzuziehen, deren Virulenz nach dem zuerst besprochenen Verfahren festgestellt worden ist. Wir sind gern bereit, anderen Laboratorien für Virulenzbestimmungen solche Standardstämme zur Verfügung zu stellen. Es muß natürlich die Virulenz solcher Stämme öfter nachgeprüft werden.

Gewisse Rückschlüsse sind aus dem Meerschweinchenversuch auch auf die Virulenz für Kaninchen und Rinder möglich. Tuberkelbazillensämme des

bovinen Typus sind nach unseren Erfahrungen als nicht hochvirulent für Kaninchen und Rinder anzusehen, wenn sie in ihrer Wirkung unter dem von uns geprüften Stamm G A liegen. Für Stämme von höherer Virulenz als G A müßten ergänzende Virulenzprüfungen an Kaninchen bzw. an Rindern stattfinden, falls mit solchen Stämmen an den genannten Tierarten Experimente ausgeführt werden sollen. Für bovine Stämme geht nach unseren Beobachtungen die Virulenz für die verschiedenen Versuchstiere parallel. Z. B. ist ein Stamm mit höherer Meerschweinchenvirulenz auch virulenter für Kaninchen und Rinder, ein für Rinder hochvirulenter Stamm zeigt diese Ueberlegenheit anderen, weniger virulenten Stämmen gegenüber auch am Meerschweinchen und Kaninchen. Dagegen ist nicht etwa ein humaner Stamm, der sich im Meerschweinchenversuch wirksamer zeigt als ein boviner, stets auch virulenter als dieser für Kaninchen und Rinder. Es entspricht dies den Erfahrungen der Englischen Tuberkulosekommission.

Es sei noch einmal betont, daß das abgekürzte Virulenzprüfungsverfahren ohne Heranziehung der Kultur lediglich gröbere Unterschiede in der Virulenz verschiedener Tuberkelbazillenstämme hervortreten läßt. Vielleicht stellt es aber doch gegenüber den früher vielfach angewandten sehr groben Methoden einen Fortschritt dar. Die ausführliche Prüfung der Virulenz mittels des Kulturverfahrens wird durch dieses lediglich orientierende Verfahren keineswegs entbehrlich.

Unsere Untersuchungen zur Frage der Virulenzbestimmung bilden nur einen Anfang. Wir möchten glauben, daß ihre Fortführung aus manchen Gründen von großem Interesse ist. Jedes Arbeiten mit Tuberkelbazillen im Laboratorium, sei es zum Studium des Vorganges der Infektion oder prophylaktischer und therapeutischer Maßnahmen, erfordert unbedingt eine genaue Kenntnis der Virulenz des zu den Versuchen benutzten Stammes. Wenn dies schon für das Meerschweinchen gilt, so ist es erst recht bedeutsam für Versuche an Kaninchen, an Schafen und Rindern. Ich glaube, daß viele grobe Irrtümer in der Vergangenheit, besonders in der Beurteilung prophylaktischer und therapeutischer Wirkung im Tierversuch vermieden worden wären, wenn die Autoren über die Virulenz der von ihnen verwandten Tuberkelbazillenstämme besser orientiert gewesen wären. Zweitens haben Untersuchungen der Art noch Interesse aus einem ganz anderen Gesichtspunkte heraus. Sie gestatten wenigstens bis zu einem gewissen Grade eine Beantwortung der wichtigen Frage, inwieweit der Verlauf der Tuberkuloseerkrankung beim Menschen durch die Virulenz der infizierenden Bazillen bedingt ist. Nach unseren Beobachtungen ergibt sich kein regelmäßiger Parallelismus zwischen Virulenz und Schwere der Erkrankung, wenn auch wohl im allgemeinen etwas häufiger abgeschwächte Tuberkelbazillen bei einem gutartigen Krankheitsverlauf gefunden wurden. Wir haben aber z. B. zweimal abgeschwächt virulente Stämme bei tödlicher Meningitis beobachtet. Auch Opitz und Sherif¹⁾ fanden abgeschwächt virulente Bazillen einmal in einem Fall von Miliartuberkulose plus Meningitis. Zwei andere Stämme abgeschwächter Virulenz von den 19 geprüften wurden allerdings gewonnen aus je einem Fall von Knochentuberkulose und Halsdrüsentuberkulose. Man darf aus diesen und unseren Beobachtungen, wie wir glauben möchten, nicht den Schluß ziehen, daß nun die Virulenz der Tuberkelbazillen für den Verlauf der Tuberkulose bei Mensch und Tier ganz ohne Einfluß ist. Ein solcher Einfluß kann sehr wohl vorhanden sein. Er kommt aber offenbar vielfach deswegen nicht zur Geltung, weil ein anderer Faktor den Verlauf der tuberkulösen Infektion ganz wesentlich mitbestimmt, nämlich die natürliche individuelle Widerstandsfähigkeit.

1) Monatsschr. f. Kinderheilk. Bd. 37. 1927. S. 384.

Nachdruck verboten.

Zur Morphologie der Parasiten der chronischen Malaria.

Von Dr. **G. J. Perekropoff.**

Mit 1 Tafel.

(Dem hochgeschätzten Herrn Professor **N. G. Kuschew** zugeeignet).

Indem ich bei der Behandlung der Malaria mit allen denkbaren Mitteln die Anzahl und Morphologie der Parasiten im Blute der Kranken ständig beobachtete, verzeichnete ich unter Berücksichtigung von Zeit und Stunde sowie auch der Dosen des jeweiligen Medikaments nicht nur den Untergang der Plasmodien, sondern auch deren Veränderung — ihre Involution. Bei den unzähligen Untersuchungen des Blutes chronischer Malaria hatte ich wiederholt Gelegenheit, sämtliche Uebergangsstadien der Parasiten von den gut ausgeprägten Formen an bis zu ihrer völligen Involution oder Degeneration, wie ich sie früher unrichtig genannt habe, zu beobachten. Ich ließ die Malariashmarotzer *in vitro* in den Autokulturen längere Zeit stehen¹⁾, um ihre Lebensdauer unter verschiedenen Wachstumsbedingungen im Inkubator festzustellen, und habe so ihre allmähliche Anpassung an die neuen Existenzbedingungen beobachtet. Als ich die zu verschiedener Zeit ihres Lebens in den Autokulturen gefundenen Parasiten mit den Arten derselben, die von mir im Blute chronischer Malaria angetroffen wurden, verglich, kam ich unwillkürlich zum Schlusse, daß die chronische Malaria die Form der Erkrankung oder ihre klinische Aeußerung ist, die durch die im Blute der Kranken vorhandenen Involutionsformen der Malariashmarotzer hervorgerufen wird. Die künstliche Züchtung der Malariaplasmodien *in vitro*, die Beobachtungen der morphologischen Veränderungen der Parasiten bei und ohne Behandlung in akuten Fällen und Rezidiven der Erkrankung, die Auffindung der Schmarotzer im chronischen Verlauf der Krankheit und die Vergleichung der Plasmodienformen aus den Kulturen mit denen aus dem Blute der Kranken gaben mir somit die Möglichkeit, über die Ursache der chronischen Malaria einen bestimmten Schluß zu ziehen.

Die erlangten Befunde haben mich auch zur Verneinung des Parapaludismus französischer Autoren und all jener komplizierten Einteilungen der klinischen Malariabilder geführt, wie sie von verschiedenen Forschern und besonders von Prof. **Luria** unter Verwendung einer Nomenklatur, die in vielen Punkten weder den Forderungen der Klinik noch der Parasitologie Genüge leistet, aufgestellt worden sind. Meiner Meinung nach gibt es nur 2 Stadien dieser Krankheit, ein aktives und ein inaktives mit verschiedenen klinischen Erscheinungen, weil wir bei sorgfältigster Untersuchung des Blutes von Malaria-kranken doch stets Parasiten in der einen oder anderen Form der Entwicklung — gut ausgeprägte Plasmodien oder Involutionsformen — antreffen. Meines Erachtens gibt es keine Malaria ohne Parasiten, wie es keine sonstigen Infektionskrankheiten ohne ihre Erreger gibt. Wenn **Noguchi** nachgewiesen hat, daß die progressive Paralyse, die früher für eine parasyphilitische Erkrankung angesehen wurde, durch Syphilisspirochäten hervorgerufen wird, so wird sich auch analog die Lehre von einem „Parapaludismus“, der ebenso-

1) Ich habe über 250 Versuche mit künstlicher Züchtung von Malariaparasiten in verschiedenen Variationen angestellt.

gut auch „Ortho“- oder „Metapaludismus“ genannt werden könnte, nicht festhalten lassen. Hängt doch die klinische Aeußerung der Malaria von dem einen oder anderen direkten oder indirekten Einfluß der Parasiten auf den Gesamtorganismus oder einzelne Organe desselben ab, wie z. B. Kachexie, Erkrankung der Leber, der Nieren, des Nervensystems und anderer Organe. Ebenso kann sich das klinische Bild des Malariaverlaufes je nach der Virulenz der Parasiten, ihrer Anzahl und der Widerstandsfähigkeit des Organismus selbst gegenüber der Infektion oder nach der Stabilität des Gleichgewichtes, das durch die Wechselwirkung zwischen diesen beiden Kräften geschaffen wird, ändern. Diese Bedingungen im Leben der Parasiten innerhalb des Malarikerorganismus können auch für den Ausgang des Kampfes entscheidend sein: Kommt der Kranke in gute Lebensbedingungen und entsprechende Behandlung, so gehen die Parasiten zugrunde, und es tritt volle Genesung ein; wenn dies aber nicht der Fall ist, so gewinnen die aktiven Kräfte der Parasiten die Ueberhand, und der Organismus kann im ungleichen Kampf zugrundegehen. Meist aber halten die Abwehrkräfte des Organismus der Kraft der Parasiten den Widerpart, und es entsteht ein relatives Gleichgewicht, das durch verschiedene, von außen wie auch von seiten der Parasiten selbst kommende Impulse gestört werden kann.

Ich will mich nicht bei der Beschreibung und Analyse der klinischen Bilder der Malaria und speziell ihres chronischen Verlaufes in ihren verschiedenen Erscheinungen (latente, maskierte usw. Malaria) aufhalten und beziehe mich diesbezüglich auf die Beschreibungen von G. Janni, Bignami, Carducci, Caccini, Celli, Ruge, Plehn, Ziemann, Marchoux, Grall, Clarae, Kotschanowsky, Ssobolew, Kuschew u. a. mit ihren ausführlichen Untersuchungen der Morphologie des Blutes wie auch anderer Veränderungen in seinem Serum: der Toxine, Antitoxine, Lysine und der verschiedenen Parasiten, die leider aber keine Hinweise auf die Malariaparasiten, die der Involution ausgesetzt waren, enthalten. Erwähnt sei nur, daß Ziemann in den Involutionsformen der Plasmodien diejenigen Formen derselben zu sehen glaubte, die den Organismus zur selbsttätigen Heilung von der Malaria führen, womit ich aber nicht einverstanden bin. Jedenfalls hat noch niemand, trotzdem fast ein halbes Jahrhundert seit Laverans Entdeckung der Malariaparasiten vergangen ist, seine Aufmerksamkeit den Involutionsformen dieser Blutschmarotzer geschenkt. Abgesehen von meiner Arbeit „über die Wirkung des Aethylhydrokuproins bei der Malaria“ 1914¹⁾ hat nur Schingarewa 1924 die Morphologie derselben beschrieben, nachdem die ersten diesbezüglichen Hinweise von Berenberg-Gossler und Silberstein (1905) (über „die Morphologie der Malariaplasmodien des Menschen und der Tiere“) erfolgt waren, und auch darüber Werner und Ziemann in den Untersuchungen der Plasmodien aus den Kulturen (1912) und später auch Dobrotin in seiner Arbeit „über die innerliche Eingießung von Chinin bei der Malaria“ (1922) berichtet hatten. Alle aber gaben weder eine Beschreibung des morphologischen Habitus derselben noch auch ihrer Wirkung auf den Organismus des Kranken und bringen ihre Anwesenheit nicht mit der chronischen Malaria in Verbindung. Weiter sei auf die Arbeit Steins „über die Morphologie der Parasiten der Malaria tertiana“ hingewiesen, der in seinen Schilderungen der Malariaschmarotzer vom Typus der *M. vivax* die Involution derselben zwar erwähnt, aber kein erschöpfendes Bild derselben gibt. Auf diese Angaben beschränkt sich die ganze mir zugängliche Literatur in dieser Frage.

Indem ich das Wachstum der Parasiten in Autokulturen in vitro und

1) Charkower med. Zeitschr. 1914.

speziell das der aus dem Blute chronischer Malariker gewonnenen Schmarotzer studierte, konstatierte ich Entwicklung derselben in Zylindern, die aber nicht so weit ging, daß sie sich zu gut ausgebildeten Plasmodien hätten auswachsen können, wie wir das in akuten Erkrankungsfällen und Rezidiven beobachten. Als ich den Nährboden für die Plasmodienkulturen der chronischen Malaria endlos variierte, konnte ich unter gewissen Bedingungen ein besseres Wachstum derselben beobachten. Ersetzte ich in den Kulturen das bei 42° während 1 Std. inaktivierte Blutserum durch frisches, bei 56° C inaktiviertes Serum unter Zusatz einer geringen Menge Dextrose und frischer Erythrozyten, so erzielte ich auch bessere Wachstumsresultate in vitro. Wurden endlich bei sonst gleicher Wiederholung dieser Versuche Auszüge aus Mückeninfusum zugesetzt, so wuchsen die Parasiten noch besser; doch muß ich bemerken, daß unter diesen Bedingungen ein Wachstum nur an Individuen der Gametenreihe beobachtet wurde. Diese Befunde zeigten, daß die Malaria-parasiten unter gewissen Lebensbedingungen aus Involutionsformen sich zu gut ausgeprägten Arten entwickeln¹⁾.

Eine Entwicklung der Involutionsformen der Malariaplasmodien in vitro bis zu ihrem normalen Habitus, wie wir ihn in frischen Paludismusfällen im Blute der Kranken antreffen, ist offenbar dank der Unvollkommenheit der Technik für die Kultur dieser Protozoen einstweilen nicht zu erzielen. Aus dem Krankenblute, aus dem unter natürlichen Verhältnissen die Produkte der Lebenstätigkeit der Parasiten selbst entfernt werden, läßt sich in vitro diese Entfernung ohne Schaden für die Plasmodien noch nicht in vollem Maße bewerkstelligen, weshalb sich die Parasiten in vitro auch nicht zu voll ausgeprägten Formen entwickeln können. Auch die destruktiven Veränderungen in den Zellen der Parasiteninvolutionsformen regenerieren sich in den Kulturen schwerer als im Blute der Kranken. Die Infektion der Mücken aber durch das Blut chronischer Malariker mit den darin enthaltenen Involutionsformen der Parasiten scheint mir von keiner großen Bedeutung für den Nachweis ihres Regenerationsvermögens zu sein; um keiner scharfen Kritik ausgesetzt zu werden, betonen wir, daß wir bei solchen Versuchen nicht sicher sein können, daß in den Mückenmagen nicht auch gut entwickelte Plasmodienformen gelangen, die sich als vereinzelte Exemplare in den verhältnismäßig frischen Formen des chronischen Paludismus finden; zweitens muß ich bemerken, daß Parasiten vom Schizontentypus im Mückenmagen schnell zugrunde gehen und der Entwicklung ihrer Geschlechtsformen Platz machen. Ferner ist es jetzt von einer Reihe von Forschern festgestellt, daß die Malaria-rezidive nicht allein durch die Geschlechtsformen der Parasiten, sondern auch durch Teilung der Schizonten entstehen können²⁾.

Die Versuche, Mücken mit Kulturen zu infizieren, gelangen mir nicht völlig, und zwar aus 2 Ursachen: in einigen Fällen mieden die Mücken das Blut ganz, das aus Probiergläschen mit Plasmodienkulturen stammte, und in anderen Fällen gingen sie, wenn sie es einsogen, verhältnismäßig schnell zugrunde, ohne irgendwelche wesentliche Resultate bezüglich der Plasmodienentwicklung in denselben ergeben zu haben.

Versuche mit Infektion von Menschen mit Kulturen der Involutionsformen der Plasmodien habe ich nicht angestellt: Uebertragung auf Tiere, die bekannt-

1) In meinen Arbeiten über die Kultivierung der Schmarotzer habe ich mich von der Rückständigkeit, nur solche Parasitenarten, die in den Lehrbüchern und den Arbeiten über die atypischen Formen angeführt werden, zu berücksichtigen, freigemacht und verfolgte ihren Lebenszyklus weiter.

2) Die Frage über die Entstehung der Malariarezidive aus Schizonten ist nicht neu, denn auf sie haben schon eine ganze Reihe italienischer Forscher der 90er Jahre sowie auch Plehn aufmerksam gemacht.

lich gegen Malaria immun sind, mißlang ebenso wie Impfungen mit gut entwickelten Parasiten. Immer aber bemerkte ich bei in vitro-Züchtung der Involutionsformen der Malariaplasmodien, daß sie zwar in den Kulturen sich entwickeln, aber nicht vollständig, was davon abhängt, wie schon oben erwähnt, daß die Technik noch nicht ausreichend ausgearbeitet ist.

Dagegen erhielt ich bessere Ergebnisse bei Regenerationsversuchen der Involutionsformen mit Malariaplasmodien bei künstlicher Provokation des chronischen Paludismus. Das biologische Gesetz lautet ja, daß jede Zelle der Protisten ihr chronisches und physikalisches Lebensoptimum hat, bei dem sie sich gut entwickelt. Wird durch äußere Einwirkung die Grenze dieses Optimums überschritten, so wird das Leben der Zelle des Parasiten entweder vernichtet, oder es zeigt sich ein Impuls zu schnellem Wachstum und Vermehrung. Letztere Art der Einwirkung auf die Zelle trat sehr deutlich in den Versuchen mit Cyadin (einem Cyanprodukt von Prof. Tschelinzew) zutage, welches durch Erhöhung des partialen Druckes der Kohlensäure im Blute das intensive Wachstum der Parasiten und die schnelle Vermehrung derselben sowie die Teilung der Gameten (wie ich schon in meiner Arbeit „über die atypische Entwicklung der Parasiten der Tropenmalaria“ erwähnt habe) fördert. Daß Kohlensäure oder Sauerstoffmangel einen Impuls zu schnellerem Wachstum und zur Teilung der Parasiten in bestimmten Stadien ihrer Entwicklung ausübt, das ist schon von Prof. Ssawtschenko und Woinow durch Zuschmelzen von Glasröhren mit Kulturen und damit verbundene Verhinderung des Sauerstoffzutritts experimentell bewiesen worden.

Noch bessere Ergebnisse lieferten die Versuche mit Provokation von Malariarezidiven und Auftreten von Malariaparasiten im Blut bei Anwendung minimaler Dosen Chinin, Waschblau und Arsenik, worüber ich in meiner Arbeit „über die Wirkung des Hydrochlor-Hydrochinins bei der Malaria“ berichtet habe, sowie bei Eingießung von Salvarsan in geringen Dosen. Diese Tatsache im Leben der Parasiten erklärt sich völlig vom Standpunkte der Lehre Ehrlichs, „daß die Substanzen, die in großen Dosen angewandt auf die Parasitenzellen tödlich wirken, in minimaler Quantität nur als Stimulus zu ihrer Erregung und besserem Wachstum dienen werden“, was auch S. Orłowsky, mit Hefekulturen bewies, denen er Arsenik in minimaler Menge zusetzte und dadurch besseres Wachstum erzielte. Auf alle schon gut bekannten Fälle von Provokation der Malaria durch Einführung von fremdartigem Eiweiß (Seren), eiweißfreien Körpern (Alkohol) und anderen Substanzen organischen Ursprungs kann ich hier nicht eingehen. Erwähnt sei nur, daß auch Schwächung des Organismus durch Steigen der Temperatur, Ermüdung (Kriegsmärsche, Sport), Hydrotherapie, mit Temperaturerhöhung verbunden usw. dank dem, daß die Plasmodien im geschwächten Organismus erhöhtes Anrecht auf Entwicklung erhalten, Malariarezidive hervorrufen.

Aehnliche zahllose Versuche, die ich angestellt habe, ermöglichten es mir, die Wiederentstehung der Involutionsformen der Malariaparasiten im Organismus der Kranken zu verfolgen und veranlaßten mich dazu, die Entstehung der Malariarezidive in Abhängigkeit von der Teilung der Geschlechtszellen der Schmarotzer, wie das Schaudinn, Grassi, Karreweg, Merz, Blumlien, von der Hybst u. a. angenommen haben, zu verneinen. Ich schließe mich damit vollständig der von Kuschew und Ziemann vertretenen Ansicht an, daß die Frage der Malariarezidive noch einer gründlichen Prüfung bedarf. Ich habe mich hierüber in meiner Arbeit „über intramuskuläre Chininjektionen“ 1920 ausgesprochen. Schon Bastianelli hat zugegeben, daß die Malariarezidive mit dem Beginn der pathogenen Tätigkeit der Parasiten des Schizontentypus, die einen regelmäßigen Lebenszyklus haben, anfangen

können. Plehn weist darauf hin, daß die zurückbleibenden Ringformen der Parasiten Rezidive hervorrufen können, wie das auch in dem Auftreten von Malariaanfällen zwischen dem Beginn der Erkrankung bis zur Entwicklung der Gameten im Blut zu beobachten ist. Nach Berenberg-Gossler entstehen einige junge Malariaparasiten nicht nur durch Sporulation, sondern auch durch Abspaltung des Chromatins von seiner Masse. Stephens zeigte ebenfalls, daß bei den an Protoplasma und Chromatin armen Parasiten das letztere sich in 2—3 und 6 Klümpchen spalten und so den Beginn zur Bildung neuer Individuen ohne Sporulation setzen kann, und daß ferner die Malariarezidive so ohne Teilnahme der Gameten gebildet werden können.

Daß die Frage der Malariarezidive noch nachgeprüft werden muß, beweisen zahllose Beobachtungen über das Leben und Wachstum der Parasiten sowohl im Blute der Kranken als auch in den Kulturen. Ich hatte, ähnlich wie Prof. Kuschew, wiederholt Gelegenheit, in Blutaussstrichen zu beobachten, wie auch bei sorgfältigster Untersuchung derselben lediglich Schizonten zu entdecken waren, und dennoch traten Malariarezidive ein. Eine von mir im 29. Arztbezirk der Moskau-Kasaner Eisenbahn vorgenommene winterliche Massenuntersuchung zeigte, daß in lange nicht allen Rezidivfällen, und zumal den künstlich hervorgerufenen, Gameten im Blut und ihre Teilung schuld sind¹⁾. Die Angaben z. B. von Abrami, der die Malariarezidive als durch Teilung der Gameten entstanden betrachtet und sie für enzystierte Formen erklärt, die sich unter dem Einfluß der Abwehrkräfte des Organismus, der Schizontenlysine, bildeten, sind meiner Meinung nach auch nicht beweisend. Man kann wohl nicht die Gameten im strengen Sinne des Worts als zystenbildende Parasitenformen betrachten, da sich diese Formen im Blute der Kranken in einem Prozesse langsamer Chromatinproliferation und Pigmentansammlung befinden. Daher sind diese Formen vegetative und stehen in einem ununterbrochenen Lebensprozeß. Der Halbmond kann für eine enzystierte Parasitenform auch noch deshalb nicht gehalten werden, weil die Rezidive auch durch die intakt gebliebenen unter den durch die Kräfte des Organismus und der medikamentösen Therapie zerstörten Schizonten (wie das zuerst Bastionelli und Plehn angegeben haben) oder durch Regeneration der Involutionsformen der Malariaschmarotzer (was ich gelegentlich habe wahrnehmen können) entstehen können. Um die letztere Annahme, d. h. die Entstehung der Rezidive aus den Involutionsformen der Parasiten zu beweisen, wurde von mir bei den zuvor erwähnten Winteruntersuchungen eine Gruppe von 128 Mann mit chronischer Malaria ausgeschieden, in deren Blute es mir trotz sorgfältigster und wiederholter Untersuchung nicht gelang, gut ausgeprägte Parasiten, geschweige denn Gameten aufzufinden; trotzdem hatte ich im Frühjahr in 60,2 Proz. Rezidive, ungerechnet die von mir künstlich hervorgerufenen. Diese Versuche überzeugen mich, daß die biologischen Gesetze des Wachstums in einer bestimmten Periode des Zellenlebens, wie sie im Tier- und Pflanzenreich beobachtet werden, auch den Malariaplasmodien nicht fremd sind. Wenn ich die Versuche in der entgegengesetzten Richtung anstellte, d. h. wenn ich die Parasiten im Blut der Kranken mittels Verordnung von Jod, Chlorammonium, Salol, Salizylpräparaten und anderen auf die Parasiten fast ohne Wirkung bleibenden Mitteln oder durch Verabreichung geringer Dosen Waschblau, Chinin, Arsenik in Mengen, die zur Ertötung derselben im Blut nicht hinreichend waren, zum Durchlaufen ihrer Involutionsstadien zwang, so konnte ich Involutionsformen der Plasmodien in jeder beliebigen Periode des akuten

1) In den Fällen, wo ich bei wiederholter Blutuntersuchung nur Schizonten, aber keine Gameten zu Gesicht bekam, versuchte ich Rezidive hervorzurufen, was mir auch in einem großen Prozentsatz gelang.

Malariaverlaufes erhalten. Diese Versuche zeigten, daß sich die Parasiteninvolution im Blute der Kranken nach Wunsch erzeugen und zum Stillstand bringen läßt, sowie daß man das Rezidiv der Erkrankung zwingen kann, nach längerem oder kürzerem Intervall, das sich durch die Gesamtheit der auf die Verschärfung der Malaria wirkenden Ursachen bestimmt, sich erneut wieder einzustellen. Bildung von Malariaparasiten beobachteten wir ebenfalls im Blute der Kranken nach Chiningaben. Unter den damit gegebenen Bedingungen ihrer Bildung war eine interessante Erscheinung im Blute der Malariker wahrzunehmen. Wenn wir z. B. die Anzahl der Parasiten erstmalig vor der Chinindarreichung und zum zweiten Male nach derselben berechnen, so stimmt die Zahl der Involutionsformen der Schmarotzer plus übrig gebliebene gut ausgeprägte Plasmodien mit der Anzahl derselben vor der Behandlung fast überein (in einigen Fällen beträgt sie je nach der Berechnungszeit und der Dose des Medikaments mehr oder weniger). Man empfängt den Eindruck, daß nicht bei allen Parasiten schneller Tod erfolgt, sondern daß ein großer Teil derselben erst im Verlauf des Involutionsstadiums von den Kräften des Organismus vernichtet wird. Bei natürlichem Verlauf der Malaria beginnt der Zerfall der Parasiten und die Bildung der Involutionsformen mit dem Moment der Temperaturerhöhung und Parasitenteilung. Eine große Anzahl von Involutionsformen ist im Blute der Kranken in der Periode des Temperaturabfalls und im ersten Stadium der Apyrexie zu beobachten, vor dem Anfalle sind sie dagegen nur in sehr kleiner Anzahl im Blut vorhanden. Diese Erscheinungen im Leben der Plasmodien stehen mit dem biologischen Gesetz des Kampfes ums Dasein keineswegs im Widerspruch. Wir wissen, daß jede Zelle oder jedes Lebewesen, das den Gesamtbestand einer Unzahl solcher Zellen vorstellt, den Kampf um seine Existenz führt und entweder zugrunde geht oder aber Veränderungen erleidet und sich an neue Lebensbedingungen anpaßt. Mir wird die Leugnung der Involutionsformen bei den Malariaplasmodien, wie einige Autoren es tun, unverständlich; warum leugnen wir denn diese Tatsachen nicht auch in der Insektenwelt und besonders bei den Bakterien, mit deren Virulenz wir bisweilen sogar im Stadium ihrer Involution, wie z. B. bei den Erregern des Typhus, der Diphtherie, der Cholera u. a., sehr ernstlich rechnen? Wenn sich diese Plasmodienformen beim natürlichen Malariaverlauf ohne medikamentöse Therapie bilden, so treten sie bei Behandlung der Erkrankung mittels kleiner Dosen Chinin, Waschblau oder Salvarsan im Blute der Kranken in noch größerer Anzahl auf. Deshalb gab ich in meiner Arbeit „über die Behandlung der Malaria nach dem Nochtschen Verfahren“ an, daß diese Behandlungsmethode einen weit größeren Prozentsatz an Rezidiven ergibt, als die Verabreichung großer Dosen Chinin¹⁾. Ohne die Tatsache der indirekten Wirkung des Chinins auf die Malariaplasmodien in vitro (Epstein) zu leugnen, muß ich doch darauf hinweisen, daß das Chinin auf die Blutschmarotzer bei Malaria auch direkt wirkt, und mich dafür auf die Arbeiten von Morgenroth, Halberstätter und Alexejew sowie auf meine eigenen Beobachtungen bei der intravenösen Injektion von Chinin in großen Dosen berufen, worüber ich in meiner Arbeit über die intravenösen Einverleibungen des Salzes dieses Alkaloids bei Malaria berichtet habe²⁾. Wenn wir dazu nur die indirekte Wirkung des Chinins auf die Malariaparasiten im Blute der Kranken berücksichtigen, so wird uns seine Anwendung bei der prophylaktischen Chininisation, die doch einen ziemlich realen Untergrund besitzt, unverständlich.

1) „Wratschebnoje Djelo“, Charkow 1924.

2) Verhandlungen der 1. Aerktekonzferenz in Kasan 1923, und: Annal. tropical. Belgie, 1924.

Es bilden sich also Involutionsformen der Plasmodien im Blute der Kranken bei natürlichem Verlaufe der Krankheit in geringerer, bei Behandlung in größerer Anzahl. Viele Plasmodien, an die neuen Lebensbedingungen sich anpassend, wiederholen sogar (wenn sie nicht gänzlich durch Medikamente und die Kräfte des Organismus vernichtet werden) den Entwicklungszyklus der früheren Generationen. Unter den oben angegebenen Bedingungen der Bildung von Involutionsformen der Parasiten im Blute der Kranken, wie sie unter dem Einfluß des Medikaments erfolgt, sehen wir zuweilen, daß der übrig gebliebene Teil des Plasmodienprotoplasmas so gering sein kann, daß es bei der Färbung kaum bemerkbar wird, und daß dann das Chromatin des Schmarotzers wie ein nacktes Gebilde erscheint. In solchen Fällen ist das Chromatin gleichsam von einer hellen Zone umgeben, was besonders gut zu sehen ist, wenn der Kern entweder dem Erythrozyten nahe anliegt oder sich auf ihm befindet. In diesen Fällen behalten die Zellen des Parasiten ihre Lebensfähigkeit bei, und das übrig gebliebene Chromatin kann einen Impuls zu neuer Entwicklung des Protoplasmas und der gesamten Zelle des Malariaparasiten geben. In einigen Fällen aber kann man unter der Chininwirkung, die das Parasitenprotoplasma am frühesten schädigt, während die Kerne sehr lange widerstehen, um das Chromatin herum nur Reste eines Parasitenkörpers erblicken, die unter günstigen Verhältnissen gleichfalls ihre ursprüngliche Gestalt wieder erlangen können. Unter ungünstigen, vom Medium bedingten Verhältnissen, in denen die Parasiten leben, kann, wie oben erwähnt, auch eine frühzeitige Teilung des Chromatins erfolgen, seine Abspaltung von der Gesamtmasse in Gestalt einzelner, verschieden großer Klümpchen vermag besondere Parasitenindividuen zu ergeben und den Anfang zu neuen Generationen zu legen. Es ist möglich, daß gerade in der frühen Abspaltung von Chromatin bei gut ausgeprägten Parasiten die Ursache dafür liegt, daß nach anfänglicher regelrechter Wiederkehr nach je einem oder zwei Tagen die Anfälle nunmehr täglich erfolgen.

So können also die Plasmodien, unter der Einwirkung vieler Ursachen auf ihr Leben in vivo und in vitro, Involution erleiden; schneller in Probiergläschen und langsamer im Blut der Kranken. Folglich kann ihre Involution in ausgedehntem Maßstabe in vitro beobachtet werden, da sie in diesem letzteren Falle nicht über so günstige Entwicklungsbedingungen verfügen, wie sie im Blute der Kranken vorhanden sind. Wenn sie aber auch im Krankenblut nicht in jedem beliebigen Moment Bürgerrecht erlangen, so liegen offenbar außer den Abwehrkörpern des Organismus und den ihr Wachstum beeinflussenden Körpern noch andere Bedingungen vor, wie wir sie in anderen Gebieten der Natur und im besonderen an den Protisten, z. B. denen der Warmblüter (Vögel) oder Kaltblüter (Reptilien, Fische, Amphibien), beobachten. Bereits zu Beginn der 90er Jahre wies Prof. Danilewsky darauf hin, daß die Protozoen des Vogelblutes im peripherischen Blute lediglich in der Sommerperiode angetroffen werden können, und er an Vögeln, die im Laboratorium unter Bedingungen lebten, welche ihrem Leben in Freiheit annähernd entsprachen, die Beobachtung gemacht habe, daß zur Winterszeit in ihrem Blute keine Parasiten aufzufinden waren und diese erst mit Eintritt des Frühjahrs sich einzustellen begannen. Analoge Versuche wurden auch von mir mit Hämogregarinen bei Kaltblütern (Reptilien) angestellt, die unter den gleichen Lebensbedingungen im Terrarium wie im Freien sich befanden, die sich dem Winterschlaf nicht ergaben und keine Nahrung zu sich nahmen. In dem Blute dieser Reptilien konnte ich im Winter Gregarinen nur selten auffinden; sie vermehrten sich jedoch schnell mit dem Frühlingsanfang, und noch zahlreicher wurden sie mit dem Beginn der Nahrungsaufnahme. Diese Tatsachen geben einen

Hinweis darauf, daß auch die Involutionsformen der Malariaparasiten mit Frühlingsanfang infolge des gesteigerten Stoffwechsels im Organismus und der besseren Ernährungsverhältnisse für die Parasitenzellen erwachen. Ich bin daher der Ansicht, daß auch die gut ausgebildeten Parasiten, die ich im Blute der von mir untersuchten Personen in der Winterzeit ziemlich häufig angetroffen habe, keine aktive Malariaform darstellen, daß sie jedoch, und zwar nicht nur Gameten, sondern auch Schizonten, mit Frühlingsanfang lebensfähig und aktiver werden. Wenn wir schließlich im Licht der modernen Lehre eine Zyklusvermehrung der Madenwürmer (*Oxyuris vermicularis*) oder eine ähnliche Entwicklung bei den pathogenen Amöben annehmen, so meine ich, daß wir auch nicht berechtigt sind, das Gesetz des Keimens bezüglich der Malariaplasmodien außer Geltung zu setzen. Diese Involutionsformen der Malariaparasiten können dazu noch auch als diagnostisches Kennzeichen der primären Infektion von Krankheitsrezidiven dienen. Wenn wir die Parasiten beim ersten, zweiten usw. Krankheitsanfälle nach Gesichtsfeldern zählen, so werden wir finden, daß sie bei der erstmaligen Infektion verhältnismäßig spärlich, bei den Rezidiven dagegen ziemlich zahlreich im Blute der Kranken vertreten sind. Zugleich erreichen auch bekanntlich die Rezidive selbst nicht jene Stärke, wie sie die primäre Infektion zu besitzen pflegt; sie ziehen sich nicht so in die Länge und enden schneller, da der Organismus nach bereits feststehender Schablone die Abwehrkörper schneller erzeugt, die jetzt auch mehr Involutionsformen entstehen lassen als bei den primären Infektionen. Demnach ist das Prinzip der Entstehung von Involutionsformen der Plasmodien der Kampf um ihre Existenz im menschlichen Organismus unter dem Einfluß der im Blute des Malarikers sich entwickelnden Immunkörper. Wie ich aber in meiner Arbeit über die Schizontenlyse erwähnt habe¹⁾, entwickeln sich diese Immunkörper anscheinend in zu geringer Anzahl und werden nicht dauernd genug produziert, als daß diese Plasmodienformen vom Organismus endgültig vernichtet würden, wie das beim Rückfalltyphus oder Wölnischen Fieber beobachtet wird, wo nach mehreren Anfällen die Spirochäten vollkommen verschwinden. Die Malariaparasiten hingegen machen ihr Involutionsstadium durch, wenn auch in minimaler Anzahl, bleiben aber auf unbestimmt lange Zeit im Blute der Kranken.

Daher nun haben wir bei der Malaria, wie auch bei anderen Protozoen-Erkrankungen des Menschen und der Tiere, keine stabile Immunität, und wo diese vorhanden ist, da ist sie nichts anderes als die Fortsetzung des latenten Zustandes der Infektion, in dem der Organismus die Schutzkörper ausarbeitet und so eine relative, labile Immunität aufrechterhalten. Auf diese Weise wird beim Paludismus das bekannte, schwankende Gleichgewicht geschaffen, das durch verschiedene, auf den Organismus wie auch auf die Parasiten einwirkende Ursachen gestört werden kann. Ich habe in meiner Arbeit über die Kultur der Tropenmalariaparasiten angegeben, daß es drei besondere Arten der Malariaparasiten gibt; dasselbe ist auch hier der Fall, der Charakter der Arten erhält sich auch bei der Involution, wie das auf den beigefügten Tafeln mit Abbildungen aller drei Malariaparasitenarten zu sehen ist.

Zur Erläuterung meiner Beobachtungen über die Involution der Malariaparasiten dienen die dieser Arbeit beigegebenen drei Abbildungstafeln, die eine bessere Uebersicht über ihre Größe und Form bieten, als die genannte Beschreibung es vermag. Die Präparate, nach denen die Zeichnung der Malariaparasiten erfolgte, stammten aus dünnen Blutaussstrichen, nicht aber

1) Mitteilungen aus der Mikrobiologie und Epidemiologie für Südostrußland. Saratow 1924.

aus dicken Tropfen, da in diesen auch die normalen Parasitenformen eine etwas gepreßte und klumpige Gestalt erhalten. Um Form, Aussehen und Wuchs der Parasiten in den Präparaten möglichst nicht zu verändern, bediente ich mich der Dämpfe einer 2proz. Osmiumsäurelösung und fixierte sofort die frischen, noch feuchten Blutaussstriche, wie ich das auch früher beim Studium der atypischen Parasitenformen getan habe. Innerhalb der letzten zwei Jahre habe ich diese Frage mittels der oben angegebenen Technik nochmals geprüft und bin zu denselben Resultaten wie im Jahre 1913 gekommen. Ferner wurde die Technik der Blutentnahme und des Ausstrichs sehr sorgfältig von mir selbst ausgeführt, nachdem die Objektträger in entsprechender Weise gründlich entfettet und gesäubert waren. Das Blut wurde entweder aus dem Ohre oder dem Finger, der sorgfältig mit Spiritus und Aether abgerieben war, entnommen¹⁾. Gefärbt wurde nach Romanowsky-Giemsa. Die Farblösung wurde in frisch bereitetem, destilliertem und sterilem Wasser hergestellt²⁾.

Dieselbe Fixierungs- und Färbetechnik wurde von mir auch bei der Herstellung von Blutaussstrichen aus den Kulturen angewandt. Beim Studium der Morphologie der Parasiten in den Blutaussstrichen, besonders der Schmarotzer von minimalsten Ausmaßen, ließ ich mich davon leiten, ob sie mit den Erythrozyten in der gleichen Ebene lagen, und alles, was diesem Lageverhältnis nicht entsprach, blieb für mich in dubio und wurde nicht berücksichtigt, ausgenommen die Fälle, wo ein Teil des Parasiten sich innerhalb, der andere außerhalb des Erythrozyten befand. Da ich für die Messung der Involutionsformen der Parasiten kein Mikrometer zur Hand hatte, bestimmte ich ihre Größe nach dem Durchmesser eines normalen Erythrozyten. Die Durchsicht der Blutpräparate erfolgte mit Apochromat 1,5 und Kompensationsokular 8 bei Tageslicht. Die Abbildungen auf den Tafeln habe ich teils aus den Blutaussstrichen von Kranken, teils aus Kulturen, die zu verschiedenen Stunden des Parasitenlebens *in vitro* gewonnen waren, hergestellt.

So sind alle Abbildungen der Tafel I nach Präparaten gezeichnet, welche aus Parasitenkulturen im Alter von einigen Stunden bis zu 17 und 38 Tagen angelegt waren, und parallel damit nach Präparaten aus dem Blute von Kranken, die an chronischem Paludismus 1—4 Jahre und mehr gelitten hatten. Für die Blutpräparate von chronischen Malarikern wählte ich nach Möglichkeit inaktive Fälle und nicht mit den einen oder anderen Antimalariamitteln behandelte Kranke.

Bei der Durchsicht der Plasmodienbilder von *Malaria tertiana* (Taf. I, Fig. 1—23) aus dem Blut von Kranken und bei Vergleichung derselben mit den Bildern von Kulturparasiten der ersten Stunden ersehen wir, daß sie sich wenig voneinander unterscheiden, abgesehen von der schnelleren und frühzeitigeren Teilung, die *in vitro* in den frühen Entwicklungsstadien der Parasiten beginnt. Das Protoplasma der Kulturparasiten ist mehr zerrissen; sie besitzen offenbar eine größere amöboide Beweglichkeit als die Blutparasiten. Die Figg. 24—28 stellen die Entwicklung der Kulturparasiten von der 15. bis 40. Stunde dar; die gleichen Parasiten werden im Blute der Kranken angetroffen. Hierbei ist zu bemerken, daß die Rosafärbung annehmenden Para-

1) Joffes Angabe, daß man die Involutionsformen der Malariaparasiten mit Mikroben verwechseln kann, ist unrichtig, da die Mikroben von den Parasiten sehr gut zu unterscheiden sind.

2) Dadurch ist die von Marzirowsky, Popow und Joffe gelieferte Erklärung meiner Sporozonten („über die Kultur der Parasiten der *Malaria tropica*“) durch irgendwelche hypothetische Parasiten, die sich im Wasser befänden, ausgeschlossen; die genannten Autoren haben außer acht gelassen, daß sich die Parasiten und speziell die Sporozonten unter künstlichen Verhältnissen, nicht aber in der Mücke entwickelt hatten.

siten sich mehr in den Kulturen finden; ihre Rosafärbung ist, wie ich festgestellt habe, abhängig von dem Dextrosegehalt des Nährbodens, von der Umwandlung der alkalischen Reaktion desselben in eine saure und von einer Veränderung in den Parasiten selbst, die schleimig umgestaltet erscheinen. Diese sich rosa färbenden Parasiten finden sich hauptsächlich in den intensiv wachsenden Kulturen und hängen möglicherweise auch von dem Zeitpunkt der Blutentnahme für die Kultur ab. So sind z. B. vor dem Anfall oder während desselben diese sich rosa färbenden Parasiten in dem für die Kultur entnommenen Blute weniger vorhanden als in den Kulturen aus dem am Ende des Anfalls entnommenen Blute. Von der 50. Lebensstunde der Kulturparasiten an tritt, falls nicht der Nährboden erneuert wurde (Zusatz von frischen Erythrozyten, Zucker und frischem Plasma) bei vielen Parasiten ein unregelmäßiges Wachstum ein; sie verlieren allmählich ersichtlich ihre Virulenz (Fehlen der Schüffnerschen Tüpfelung in den Erythrozyten) und verlangsamen ihr Wachstum. Ihr Chromatin ist kompakt oder gelockert mit minimaler Protoplasmaenge, das nur in Fetzen, aber nicht in geschlossener Masse vorhanden ist. In den Figg. 28 bis 38 sind die Parasiten aus der Kultur und aus dem Blute chronischer Malaria-kranker einander sehr ähnlich, so daß es unmöglich wäre, wenn man von der Schüffnerschen Tüpfelung absieht, sie zu unterscheiden. Beim weiteren Wachstume der Parasiten in vitro (Figg. 40—45) unterscheiden sich Kultur- und Blutparasiten morphologisch in nichts voneinander, mit Ausnahme der Schüffnerschen Tüpfelung (Figg. 41, 43, 44), die nur im Blute der Kranken beobachtet wird und bei den Erythrozyten in den Kulturen gänzlich fehlt. Dieser Unterschied im Aussehen der Kulturparasiten und der Parasiten von chronischen Malarikern verschwindet bei andauerndem Verlaufe der Erkrankung immer mehr. So erreicht z. B. die Größe der Parasiten, welche den Kulturen und dem Blute der Kranken in der 48.—50. Stunde bzw. in der 15. bis 50. Stunde (Figg. 47—49) entnommen worden, $\frac{1}{5}$ — $\frac{1}{6}$ des Erythrozyten-durchmessers und nicht nur beim Schizontentypus, sondern auch bei der Gametenreihe (Fig. 46), obgleich viele von ihnen, die sich in den Erythrozyten befinden, bereits ein feines, schwarzes, staubartiges Pigment aufweisen. Ebenso wie in den Kulturen der späten Stunden (100.—130.) gewahren wir auch bei den mehr als ein Jahr dauernden Formen der chronischen Malaria, die oft periodisch eine Verschärfung der Krankheitsprozesse hervorrufen, Parasiten, die einander sehr ähnlich sind (Figg. 50—58); dabei nehmen die Parasiten aus den Kulturen, aus denen die Produkte ihres Zerfalls und ihres Stoffwechsels nicht entfernt sind, eine mehr dunkle, an das Violette grenzende Färbung an, während die Blutparasiten eine mehr zartblaue Färbung erhalten. Zuweilen können wir in chronisch verlaufenden Malariafällen unter verschiedenen Bedingungen der Parasitenexistenz im Krankenblute die gleiche Färbung des Parasiten wie in den Kulturen beobachten. Ebenso läßt sich in den chronischen Malariafällen eine Parasitenteilung in eine geringere Zahl von Einzelindividuen, eine primitive Zweiteilung oder eine einfache Chromatinabspaltung wie in vitro beobachten. Die sich teilenden Parasitenformen stellen in solchen Fällen vollkommen formlose Massen dar und sind häufig gar nicht mit den Erythrozyten verbunden. Etwas seitab stehen die Schmarotzerarten (Figg. 59, 60), die sich in den Kulturen nach 50 Stunden und später vorfinden; ebensolche werden bei der chronischen Form des Paludismus im Blute, besonders bei selbständiger Behandlung seitens der Kranken (kleine Dosen in unregelmäßigen Abständen) angetroffen. Diese Formen sind als Parasiten schwer zu erkennen; wenn man sie aber gut färbt, so findet man um die kompakten Chromatinklumpchen herum Protoplasma in Resten oder in unvollständiger Entwicklung. Eine merklichere Abnahme im Wachstum der Parasiten beginnt in den späteren

Stunden ihres Lebens in vitro. So ist z. B. aus den Figg. 61—67 von Kulturen der 175. Stunde zu ersehen, daß die Rosetten der sich teilenden Parasitenformen (Fig. 62) kaum $\frac{1}{5}$ des Durchmessers des Erythrozyten, den sie unverändert lassen, betragen, während die normalen Parasiten im Blut nicht nur die Größe eines Erythrozyten erreichen, sondern sie um $1\frac{1}{2}$ —2mal übertreffen können. Eine derartige Größenabnahme der sich teilenden Formen kommt auch im Blute der chronischen Malariakranken vor; die Parasiten nehmen aber hier oft eine mehr blaue Färbung an als in den Kulturen, wo sie einen Farbton vom Violett bis zum Rot zeigen (Figg. 65, 66 u. 67). (Erwähnt sei hier eine interessante Erscheinung im Leben der Kulturparasiten: wenn die rosagefärbten Parasiten in die Erythrozyten eindringen, so nehmen sie einen bläulichen Farbton an; diese Erscheinung ist zweifellos von ihrer Ernährung mit Hämoglobin abhängig und weist auf ihre Lebensfähigkeit hin.) Schließlich kommen noch beim chronischen Paludismus in seinen verschiedenen Stadien Parasiten von winziger Gestalt vor, die kaum $\frac{1}{10}$ — $\frac{1}{15}$ des Erythrozytendurchmessers erreichen (Figg. 63—72). Die sich teilenden Formen befinden sich wie die Schizonten meistens im Blutplasma. Man kann sie bei schlechter oder ungenügender Färbung leicht übersehen oder gar nicht für Parasiten halten, vorausgesetzt, daß sie sich neben dem Erythrozyten befinden. Diese Teilungsformen der Parasiten kann man für Farbansammlungen halten, von denen sie sich durch das Fehlen der Lichtbrechung bei den verschiedenen Drehungen der Mikrometerschraube und durch Veränderlichkeit im Vergleich zur Wandelbarkeit der Gestalt jener Klümpchen leicht unterscheiden lassen, was bei den Involutionsformen der Parasiten nicht zu beobachten ist. Diese Parasiten erinnern an jene Arten, die bei chronischen Malarikern vorkommen und den Arten gleichen, die man in älteren Kulturen — 38 Tage — (Figg. 73—75) beobachtet, wobei ihr Chromatin wie ihre Kerne bei guter Färbung plastisch hervortreten und die Parasiten sehr klein bleiben. Aus diesen Vergleichen ersehen wir jene allmähliche Involution des *Plasmodium vivax* bis zu kleinsten Formen, wie ich sie in Parasitenkulturen dieser Art zu beobachten Gelegenheit hatte¹⁾. Trotz ihrer Kleinheit bewahren sie dennoch ihren morphologischen Habitus auch bei weitgehendster Involution. Die Parasiten der *Malaria tertiana* weisen in ihren Involutionsformen eine bedeutend größere Mannigfaltigkeit auf als die der *M. tropica* oder *quartana*. Ich habe mich deshalb auch in den Abbildungen auf Beibringung der mehr typischen Formen des *Plasmodium vivax* beschränkt, deren Unterscheidung auch solchen, die nicht mit Kulturen gearbeitet haben, keine Schwierigkeit bereitet. Es genügt, die Präparate einer 30stünd. Kultur sorgfältig durchzusehen, um sich von diesen Involutionsformen zu überzeugen, die den chronischen Paludismus ohne irgendwelche besondere Benennungen verständlich machen. Wie früher erwähnt, zeichnen sich die Parasiten in ihren Involutionsformen bei der *Malaria quartana* durch einen geringeren Grad der Vielgestaltigkeit aus (Taf. II). Die Parasiten der *Malaria quartana*, deren Leben ich wiederholt in vitro zu beobachten und deren Kulturformen ich mit Parasiten aus dem Blute chronisch Kranker zu vergleichen Gelegenheit hatte, glichen diesen außerordentlich, besonders in den älteren Kulturen. So finden wir auf Taf. II Figg. 1—2, außer den von mir in der Arbeit „über die Kultur der Parasiten der *Malaria quartana*“ erwähnten atypischen Formen, die gleichen Parasiten in vitro wie im Blute, lediglich mit dem Unterschiede, daß in den Kulturen die Chromatinteilung schneller, bereits in den Anfangsstadien ihrer Entwick-

1) Sämtliche zum Studium der Parasitenmorphologie dienenden Kulturen wurden mit defibriniertem Krankenblut, nicht aber mit zitronensaurer Natriumlösung angelegt.

lung einsetzt, wie wir das in den Blutplasmodien von Kranken nicht haben, d. h. es tritt in den Kulturen eine frühzeitige Teilung oder eine primitive Spaltung des Chromatins oder sogar eine Abspaltung in ungleiche Klümpchen ein. Das Protoplasma der Kulturparasiten unterscheidet sich auch durch schwächere Färbung von den Blutparasiten. In Kulturen, die 10—60 Stunden alt sind (Figg. 21—27), erleiden die Parasiten eine Veränderung; ihr Protoplasma nimmt unter dem Einflusse derselben Kulturbedingungen, die ich schon früher bei der Kultivierung des *Plasmodium vivax*¹⁾ erwähnt habe, entweder eine Rosafärbung an, oder es wird spärlich, zerfetzt und erhält einen violetten Farbton, der stellenweise in rosa übergeht (Fig. 28). Je länger die Parasiten in vitro bleiben und in den Kulturen fortwachsen, um so schneller unterliegen sie der Involution. So sehen wir, daß die Dimensionen der Parasiten nach 24 bis 48 Stunden bereits auf $\frac{1}{2}$ — $\frac{1}{3}$ ihrer normalen Größe zurückgehen und denen der Blutparasiten von chronischen Malarikern gleichkommen. Alle oben angegebenen Parasitenformen der Quartana lassen sich unschwer in den Rezidiven dieser Malariaform auffinden, ebenso wie die weiterhin noch anzuführenden Formen, die im Blute wie in vitro vorkommen, vgl die Figg. 28 bis 32 (50—100 Std. alte Kulturen). Die atypische Parasitenteilung aber (ausführlicher in meiner Arbeit „über die Kultivierung der Parasiten der Malaria quartana“ beschrieben) kommt im Blute der Kranken verhältnismäßig selten vor, dafür wird sie häufiger in den Kulturen beobachtet. Die Parasitenarten auf Figg. 33—44 habe ich oft in 24—120 Stunden alten Kulturen, also in der Zeit ihres günstigen Wachstums beobachtet; im Blute der chronischen Malaria dagegen konnte ich nur eine Rosafärbung der sich teilenden Formen und jungen Merozoiten feststellen. Rosatingierte Teilungsformen habe ich im Krankenblute selten (nur 5mal) angetroffen, dafür aber werden sie häufig in den Kulturen beobachtet. Häufiger werden rosagefärbte Parasitenformen vom Merozoitentypus zusammen mit ihren freien Formen (Figg. 38—43) oder schon innerhalb von Erythrozyten (Fig. 44) im Krankenblute beobachtet. All diese Parasitenarten sind fast um $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{2}$ und darüber kleiner als jene aus dem Blute von frischen Infektionen und nicht zu späten Rezidiven, im großen und ganzen aber bewahren sie ebenso wie in vitro die bandartige Form für die Schizonten und die runde für die Gameten (Fig. 40). Bei weiterem 1—6täg. Aufenthalt in vitro unterliegen sie der Involution noch mehr (Figg. 44—51) und häufig entbehren ihre Teilungsformen der Protoplasmafärbung fast völlig. Das Chromatin dieser Parasiten erscheint staubartig, aus Klümpchen von mannigfacher Größe bestehend; nicht selten weisen diese Plasmodien nur eine minimale Protoplasamenge auf und werden oft frei im Kulturplasma angetroffen. Dieselben Parasitenarten beobachten wir im Krankenblut von chronisch verlaufenden Fällen ohne Verschärfung des Krankheitsprozesses, aber mit Paludismuserscheinungen des maskierten Typs (larvata). In den Figg. 52—64 sind die freien Parasitenarten aus dem Blute chronischer Malariker wie aus 3—7 Tage alten Kulturen dargestellt. Aus diesen Bildern läßt sich schließen, daß die Parasiten auch im Blute der Kranken den Habitus bewahren, den wir in langwierig verlaufenden Malariafällen antreffen, daß ihre Größe aber beträchtlich geringer sein dürfte (knapp $\frac{1}{15}$ — $\frac{1}{20}$ ihrer normalen Erscheinung). In Kulturen von *Plasmodium quartana*, die älter als 4—7 Tage sind, kommen bereits Parasiten vor, die wenig an ihre frühere Form und Erscheinung erinnern (Figg. 64—67); aber auch im Blute der Kranken bilden diese Arten keine Seltenheit, werden jedoch bis heute von den Forschern aus

1) „Ueber die Kultivierung der Parasiten der Malaria tertiana“. Vortrag in der Aerztegesellschaft an der Kasaner Universität 1913.

irgendeinem Grunde ignoriert und nicht als Parasiten angesehen, die den chronischen Malariazustand aufrechterhalten. Wie wir sehen, gibt auch diese chronische Malariaparasitenart Involutionsformen bis hin zu den kleinsten Ausmaßen, wie ich sie in den Kulturen finden konnte; bei guter Färbung bewahren sie ebenfalls wie *Plasmodium vivax* ihre Grundform. Die Parasiten der *M. quartana* zeigen einen geringeren Polymorphismus als *Pl. vivax*; dafür sind sie aber in ihren ursprünglichen Erscheinungsformen viel standhafter. Die Parasiten der tropischen Malaria zeichnen sich vor denen der Quartana durch einen größeren Polymorphismus aus und zeigen Involutionerscheinungen wie andere Arten, ihr chronischer Verlauf ist aber, wenigstens in unserem Klima, ein kürzerer als in den Tropen. In dieser Hinsicht erzeugt die Tertiana am meisten Malariaformen von durchaus nicht benignem Verlauf; sie gehört daher keineswegs zu den leicht zu behandelnden Krankheiten, wie man früher annahm.

Ebenso wie die beiden vorhergehenden Parasitenarten habe ich auch das Blut von Patienten, die unzweifelhaft an *M. tropica* litten, untersucht; ferner erzeugte ich experimentell im Blute der Kranken Involutionsformen und konnte durch Vergleich ihres morphologischen Habitus mit Kulturparasiten der gleichen Art auf Erscheinungen von chronischem Paludismus als durch diese Schmarotzer unseres Blutes hervorgerufen schließen. In Taf. III mit Abbildungen der tropischen Malaria habe ich die atypische Entwicklung der Parasiten des Krankenblutes wie der Kultur, die von mir in der Arbeit „über die atypische Entwicklung der Parasiten der *M. tropica*“ beschrieben worden ist, nicht berücksichtigt. Ich führe nur hier ihre Involutionsformen zugleich mit den Formen, die ich in chronischen Malariafällen beobachtet habe, als Beispiel an: die Entwicklung und Teilung der Gameten¹⁾ und Schizonten (Figg. 6—10, 14—44, 44—63) und die sich teilenden Formen im Blute der chronisch Kranken und in den Kulturen (Figg. 64—87). Auch bei dieser Form der Malaria erfahren die Parasiten Involution und werden kleiner ($\frac{1}{5}$ — $\frac{1}{20}$ des Durchmessers eines Erythrozyten) unter Bewahrung ihres ursprünglichen Habitus und ihrer Form.

Wenn man die Parasiten aus den ersten Stunden der Kultur und aus dem Blute der Kranken vergleicht, so unterscheiden sie sich wenig voneinander, dafür nehmen sie in älteren Kulturen (bis zu einigen Tagen) an Größe en masse ab, d. h. das Chromatin, das sich gut färbt, wie das Protoplasma, das nur schlecht eine Färbung annimmt; einige Ausnahmen, bei denen eine Neigung zum Zerfließen besteht oder die sich rosa färben, finden sich in den Figg. 74—81 bzw. 47, 62, 63, 67, 71, 73 und 86, wobei zu bemerken ist, daß die sich rosa färbenden Plasmodien, wie das auch bei den vorhin genannten Parasiten der Fall ist, in den Kulturen häufiger vorkommen als im Blute der Kranken; es ist aber keine Seltenheit, daß sie mit abnehmender Größe einen violetten Farbton annehmen. Bei den Plasmodien der *M. tropica* war in vitro merkwürdigerweise eine kürzere Lebensdauer als bei den anderen (Tertiana- und Quartana-) Plasmodien wahrzunehmen; länger als 6 Tage in der Kultur lebend, habe ich sie nicht beobachten können, was wohl darauf zurückzuführen ist, daß sie, die im Blute sich befindend, einen mehr bösartigen Verlauf der Erkrankung bewirken und offenbar eine größere Menge an Produkten der Lebensbetätigung erzeugen, in der Kultur daher rascher zugrunde gehen. Durchmustert man nunmehr die Tafel mit den Abbildungen, so gewahrt man an allen drei Blutparasitenarten eine stufenweise Größenabnahme unter Bewahrung ihrer ur-

1) Hier liegt ein Mißverständnis seitens Joffes vor. Ich habe die Gametenteilung in ähnlichem Sinne wie Rocha da Lyra in seiner Arbeit gemeint und in meinem Artikel „über die Züchtung der Parasiten der Malaria tropica“ angeführt.

sprünglichen morphologischen Erscheinung. So kann man an der Tertiana etwa vier Grade einer stufenweisen Verringerung ihrer Größe verzeichnen (Figg. 1—31, 32—52, 53—69 und 70—75), ebenso bei dem Plasmodium quartana (Figg. 1—20, 21—43, 44—51 und 52—67) und nahezu vier bei den Parasiten der tropischen Malaria (Figg. 1—10, 11—22, 23—39; Figg. 44—54; Figg. 55—61—64 und 63; Figg. 62, 65, 73, 81); d. h. jede Generation gibt ein neues Parasitengeschlecht, jedoch von geringeren Ausmaßen, wobei sie den Entwicklungszyklus der vorhergehenden Formen wiederholt. In Wirklichkeit aber wird eine derartige Gesetzmäßigkeit der Größenabnahme weder im Krankenblute noch in den Kulturen beobachtet; all diese Arten werden gleichzeitig, besonders im Blute chronischer Malariker angetroffen. Ebensolchen Arten kleinster Parasiten begegnet man nicht nur im Blute chronischer Malariker, die 2—3 Jahre krank sind, sondern auch im Blute der Kranken nach einem oder zwei Malariaanfällen, sogar ohne jeden therapeutischen Eingriff; deshalb sind die Größenabstufungen, die ich in der Tabelle darstelle, ein Kunstprodukt meinerseits, um ihre Ausmaße und wahrscheinliche Entwicklung von diesen Größen aus zu veranschaulichen, eine Tatsache, die wir auch in der zoologischen Welt und bei den menschlichen Rassen wahrnehmen.

Durch diese Involutionsformen nun wird der chronische Verlauf der Malaria aufrechterhalten. Aus eigenen Beobachtungen während einer Reihe von Jahren konnte ich den Schluß ziehen, daß die äußeren Bedingungen während der Behandlung die Resultate der Vernichtung der Malariaparasiten im Blute der Kranken stark beeinflussen. Bereits Prof. Krawkow hat erwähnt, daß die Medikamentwirkung nur bei einem gewissen Vorrat an Lebenskräften und potentieller Energie des Organismus sich geltend machen kann; die Medikamente dienen als Stimulus zur Erweckung der im Organismus latenten Energie und üben lediglich die Rolle von Katalysatoren aus. Deshalb fällt im Kampf gegen die Malariaparasiten dem Organismus selbst die Hauptrolle zu. Wir finden daher auch die größte Parasitenzahl bei denjenigen Chronikern, deren Organismus schlecht ernährt wird und auch schlecht auf Chinin reagiert, weshalb er auch gegen die Parasiten keine Antikörper produzieren kann. Ich will hier nicht auf die Wirkung der Medikamente auf die Plasmodien eingehen und bemerke nur, daß die Involutionsformen trotz ihres nicht seltenen Vorkommens im Blutplasma dennoch sehr stabil gegenüber dem Chinin und anderen Medikamenten sind, die zu den wirksamsten bei dieser Erkrankung gezählt werden — was ich mir damit erkläre, daß sie sich infolge unregelmäßiger und unzureichender Verabreichung des Chinins und der anderen Mittel an diese anpassen. Auch die Involutionsstadien der Parasiten bilden toxische Stoffe, was sich in schmerzhaften Symptomen der Malaria kund gibt. Es besteht kein Zweifel, daß Toxine bei Malaria existieren; dies ist durch die Arbeiten von Minkewitsch und meine Arbeiten „über die Gigantozysten beim Paludismus“ (Charkower med. Zeitschr. 1914) sowie „über die Stabilität der Polynukleare bei Nephropathien“¹⁾ bewiesen. Was die Natur dieser Toxine betrifft, so gelang es mir bis jetzt noch nicht, diese Frage zu klären. Durch die in den genannten Arbeiten enthaltenen Beobachtungen an den Malariaparasiten im Krankenblut und besonders in den Kulturen wird ihre ziemlich kräftige Stabilität den Lebenskräften des Organismus und den Medikamenten gegenüber hinreichend erhärtet und die früher herrschende Ansicht widerlegt, daß diese Parasiten hinfällig seien und rasch der Vernichtung anheimfielen. Diese Formen habe ich auch in den Ausstrichen aus dem Blute und den inneren Organen von Leichen sogar 24—26 Stunden nach dem Tode gefunden. Die

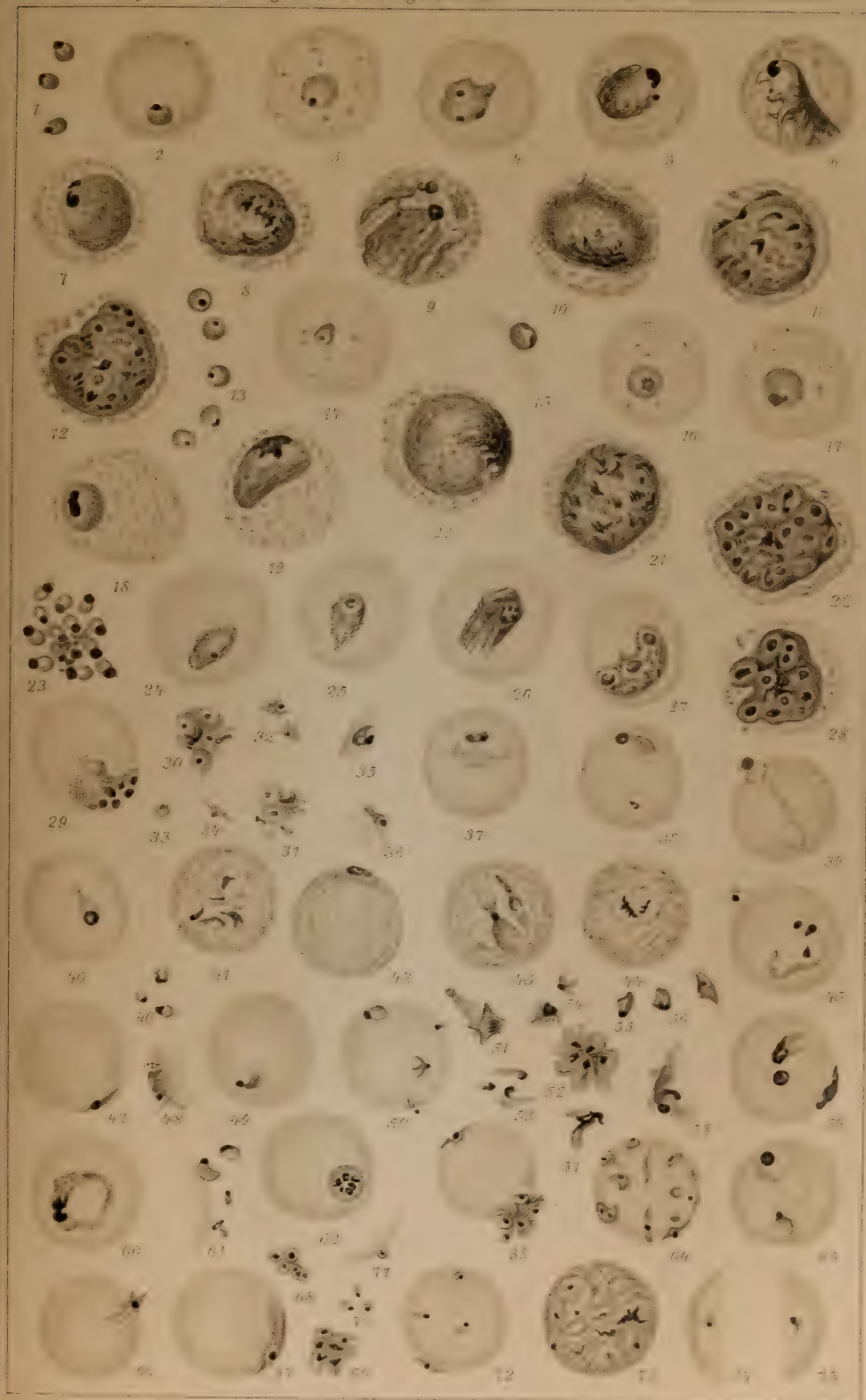
1) Vortrag in der Aerztesgesellschaft an der Universität Kasan 1923

Blutuntersuchung bei chronischen Malarikern zeigte, daß dieselben Parasitenformen auch abortive Malariaanfälle mit unbedeutender Temperaturerhöhung erzeugen, ohne daß gut ausgeprägte Parasiten im Blute nachzuweisen wären. Somit sind auch sie den Gesetzen ihres Wachstums untertan, was sich mitunter im Verlauf der Behandlung der Krankheit und oft trotz Verabreichung von Medikamenten gut beobachten läßt.

Die vorstehend geschilderten Versuche haben somit folgende Ergebnisse gehabt:

1) Es gibt keinen Parapaludismus in strengem Sinne des Wortes, wie ihn die französischen Autoren verstehen; es handelt sich hier lediglich um den gewohnten Paludismus, der chronisch unter Anwesenheit von Involutionsformen der Malariaparasiten im Blute der Kranken verläuft. — 2) Bei der Bestimmung der Behandlungsmethoden für die Malaria, bei der Dosierung des Chinins und anderer Mittel sowie bei der Entscheidung über die Dauer der Behandlung muß auch mit den Involutionsformen der Parasiten gerechnet werden (wie das in allen meinen Arbeiten geschehen ist), und darf man sein Augenmerk nicht einzig auf das Verschwinden nur der gut ausgeprägten Plasmodien aus dem Blute richten. — 3) Sind die Parasiten unter dem Einfluß der Behandlung aus dem Blute vollständig verschwunden, so treten, von Ausnahmen abgesehen, keine Rezidive auf. — 4) Die Malariarezidive nach langer Apyrexiedauer und bei Fehlen gut ausgeprägter Parasiten im Blute der Kranken werden durch die Involutionsformen der Plasmodien hervorgerufen. — 5) Die abortiven Malariaanfälle werden in ihrem chronischen Verlaufe durch Teilung und Vermehrung der Parasiteninvolutionsformen hervorgerufen, was sich durch Auszählen derselben im Blute der Kranken in den Perioden des Infektionsverlaufs feststellen läßt. — 6) Die Involutionsformen der tropischen Malaria, mehr noch die der Tertiana und noch häufiger die der Quartana führen nicht selten eine endoglobuläre Lebensweise; man kann ihre Teilungsformen nicht selten im Blutplasma antreffen. — 7) Das Studium der Involutionsformen der Malariaparasiten hat an Blutaussstrichen zu geschehen, nicht aber an dicken Tropfen¹⁾, in denen auch gut ausgeprägte Parasiten bei langsamem Austrocknen sich verändern. Außerdem lassen sich dicke Tropfen nicht so gut wie Ausstriche mit Wasser auswaschen, um Fehlerquellen (Farbe, Staubkörnchen, die zufällig auf die Präparate geraten) zu beseitigen. — 8) Abgestorbene Involutionsformen der Parasiten jeder Art und Größe werden mit den gleichen Farben (Romanowsky-Giemsa) gefärbt, nehmen aber eine grau-schwarze Färbung an, wobei das Chromatin schwarz erscheint und das Protoplasma alle Töne des Grau und eine körnige Struktur aufweist, was bei lebenden Parasiten nicht zu beobachten ist. — 9) Es ist notwendig, weitere Beobachtungen über die Involutionsformen der Malariaplasmodien durchzuführen und ihre Rolle nicht nur bei chronischer Malaria allseitig zu beleuchten, sondern auch andere Seiten ihres Lebens kennen zu lernen. — 10) Die Involutionsform der

1) Besonders in der feuchten Kammer erhalten die Parasiten aus physikalischen Gründen nicht selten eine kugelige Form.





Parasiten ist es auch, die den latenten Zustand der chronischen Malaria aufrecht erhält, indem sie deren Virulenz vermittelt der Schizontenlyse und anderer Abwehrkörper des Organismus mildert und fieberfreie Perioden von verschiedener Dauer schafft. — 11) Mit diesen Formen der Parasiten ist auch bei Chininverabfolgung zu praktischen Zwecken zu rechnen, um keine Verschlimmerung der Krankheit hervorzurufen. — 12) Anscheinend wird durch diese Involutionsformen der Parasiten der Immunitätszustand des Organismus hervorgerufen und, solange sie sich im Organismus befinden, aufrecht erhalten, d. h. sie regen die Bildung von Antikörpern an. Der Immunitätszustand verschwindet mit der absoluten Vernichtung der Parasiten im Blute der Kranken.

Erklärung der Tafelabbildungen.

- Fig. 1—23. *Plasmodium vivax* aus Krankenblut.
 Fig. 24—28. Aus 15-, 18-, 24-, 20- und 40stünd. Kulturen.
 Fig. 29—39. Aus 50—70 Std. alten Kulturen.
 Fig. 40—45. Aus 10—100 Std. alten Kulturen und aus dem Blute von chronischer Malaria.
 Fig. 46. Aus 48—50 Std. alten und späteren Kulturen.
 Fig. 47—49. Aus dem Blute von Kranken und aus Kulturen (15—50 Std. und später).
 Fig. 50—58. Aus dem Blute und aus Kulturen (100—130 Std. und später).
 Fig. 59—60. Aus dem Blute von Kranken und aus Kulturen (50 Std. und später).
 Fig. 61—67. Aus dem Blute von Kranken und aus Kulturen (175 Std. und später).
 Fig. 68—72. Aus dem Blute von Kranken und aus Kulturen (70 Std. und später).
 Fig. 73—75. Aus dem Blute von Kranken und aus Kulturen (70 Std. bis zu 38 Tagen).

Literaturverzeichnis.

- 1) Berenberg-Goßler, Beiträge zur Naturgeschichte der Malariaplasmodien. [Dissert.] Sonderabzug? — 2) Stein, R., Ueber die Struktur der Plasmodien der Malaria tertiana. (Arch. f. parasitol. Anat., Physiol. u. Klin. Bd. 159. 1920.) — 3) Involutionsformen der Parasiten, erwähnt bei: Ziemann, Werner, Dobrotin, Schingarewa und in meinen Arbeiten. — 4) Perekropoff, G. J., Ueber die Wirkung des Aethylhydrokupreins bei der Malaria. (Charkower med. Zeitschr. 1914 [russ.]) — 5) Ders., Ueber die Wirkung des Hydrochlor-Hydrochinins bei der Malaria. (Verhandl. d. 1. Malariakonferenz d. Wolgagebiets, Saratow 1924 [russ.]) — 6) Ders., Ueber die intravenöse Chinineingießung bei der Malaria. (Verhandl. d. 1. Aerztetagung d. Wolgagebiets, Kasan 1923 [russ.]) — 7) Ders., Ueber die Behandlung der Malaria nach der Nochtschen Methode. (Verhandl. d. 1. Aerztetagung des Wolgagebiets, Kasan 1923 [russ.]) — 8) Silberstein, Beobachtungen über die Entstehung von jungen Malariaparasiten aus älteren. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 34, Nr. 2—3.) — 9) Joffe, J., Kultivierungsversuche von Malariaplasmodien (Russ. Zeitschr. f. Tropenmed. 1925. Nr. 1, 2, 3.) — 10) Luria, R. A., Verhandl. d. 2. Aerztetagung des Wolgagebiets. Kasan 1923 [russ.])

Nachdruck verboten.

Ueber das Schicksal des Timotheebazillus im tierischen Organismus und über durch diesen Bazillus hervorgerufene pathologisch-histologische Veränderungen.

I. Mitteilung.

[Aus dem Bakteriologischen Laboratorium des Odessaer Staatlichen Medizinischen Instituts (Vorstand: Prof. Dr. W. Jelin).]

Von Prof. **W. Jelin** und Dr. **F. Feldmann** (†),

Die Frage nach dem Schicksal der dem Tierkörper einverleibten sogenannten „säurefesten Saprophyten“ und nach dem Charakter der durch dieselben in

1) † am 16. 1. 1927.

den Organen und Geweben verursachten pathologisch-histologischen Veränderungen darf bei weitem noch nicht als endgültig gelöst angesehen werden. Bei der Uebersicht der diesbezüglichen alten und neuen Literatur ergibt sich in diesem Punkte eine Reihe von Abweichungen, die um so wichtiger sind, als viele Autoren noch bis heute die Möglichkeit einer Umwandlung von säurefesten Saprophyten in Tuberkelbazillen zugeben. In vorliegender Arbeit haben wir uns zur Aufgabe gemacht, die besagte Frage sowohl vom bakteriologischen als auch vom pathologisch-histologischen Standpunkte aus zu untersuchen. Wir verwendeten bei unseren Versuchen den Bazillus des Timotheengrases, dessen Stamm in unserem Laboratorium vorhanden ist.

Möller, der den Timotheebazillus entdeckt hat, war überzeugt, daß dieser, einem Tiere einverleibt, in dessen Organismus dieselben Veränderungen hervorrufe wie das Tuberkelstäbchen. Bei Meerschweinchen und Kaninchen, denen Timotheebazillen einverleibt waren, fand Möller Kavernen, die denen bei Tuberkulösen ähnlich waren. Bei der histologischen Untersuchung der Tuberkeln konnte er typische Struktur wie bei Tuberkulose und das Vorhandensein von Riesenzellen konstatieren. Die Versuchstiere gingen in der Regel nach 5—6 Wochen zugrunde. Daraus schloß Möller, daß Timotheebazillen sich im tierischen Organismus in Tuberkelstäbchen umwandeln. Potet fand in solchen Fällen ebenfalls in der Bauchhöhle käsige Massen. Lubarsch, der Timotheebazillen intravenös und in die Niere einspritzte, beobachtete das Auftreten von tuberkelartigen Bildungen. Rodet und Calvielle injizierten Meerschweinchen, Kaninchen, Kälbern und Ziegen Timotheebazillen intravenös und sahen Veränderungen in den Organen, wie das bei Tuberkulose der Fall ist. Die Autoren bemerken jedoch, daß es ihnen mittels Passagen durch den tierischen Organismus nicht gelang, den Timotheebazillus dem Tuberkelstäbchen kulturell näher zu bringen. Freymuth injizierte Kaltblüter mit Timotheebazillen, wodurch er den Tod der Tiere herbeirief. Bei der Sektion fand er Tuberkeln, die aber nicht eingehend untersucht wurden. Zechnowitzer erzeugte bei der Raupe *Galleria Mellonella* durch Infizierung mit Timotheebazillen Veränderungen, die solchen beim Menschen durch Tuberkelstäbchen hervorgerufenen analog waren.

Die meisten Autoren leugnen jedoch die Fähigkeit der säurefesten Saprophyten, einen allgemeinen, für Tuberkulose typischen Prozeß zu bewirken, entweder durchaus ab oder messen ihnen das Vermögen bei, lokale Erscheinungen hervorzurufen.

Hölscher führte Reinkulturen von säurefesten Saprophyten in Venen bei Kaninchen und Meerschweinchen ein und beobachtete die Bildung von Knötchen, die ihrem Äußeren nach echten Tuberkeln ähnelten und Riesenzellen enthielten, jedoch im Gegensatz zu den Tuberkeln keine Verkäsung, sondern lediglich eine Eiterung erlitten. Die Mikroben vermehrten sich nicht im tierischen Organismus. Bei der Einspritzung besagter Saprophyten in die Bauchhöhle sah der Autor an der Bauchwand und im Omentum Tuberkelbildungen mit Riesenzellen. Abbot und Gildesleeve fanden ebenfalls bei Kaninchen und Meerschweinchen Tuberkeln, die solchen bei Tuberkulose durchaus ähnlich waren, jedoch keine Tendenz nach Vermehrung und käsigem Zerfalle an den Tag legten; sie lösen sich in Eiterung auf. Subkutane, intravenöse und intrapulmonale Infektionen mit den Haupttypen dieser Gruppe riefen jedoch bei Kälbern und Schweinen keine der Schwindsucht ähnlichen Veränderungen hervor. Courmont Paul und Descos injizierten säurefeste Saprophyten Hunden und beobachteten an der Einspritzungsstelle einen Abszeß und zwei subpleurale tuberkelähnliche erbsengroße Knötchen mit zentraler Erweichung. In den letzteren wurden säurefeste Bazillen gefunden, Riesenzellen konnten aber nicht nachgewiesen werden. Durch weitere Verimpfungen auf Meerschweinchen wurde das Vorhandensein von Tuberkulose ausgeschlossen. D'Amore, der Tiere mit säurefesten Saprophyten auf verschiedene Weise impfte, beobachtete einen lokal beschränkten Prozeß, wobei sich keine Neigung zur Verbreitung kundgab. Ausgang: Eiterung, keine käsige Degeneration. Zudem sehen die Riesenzellen anders aus als bei der Tuberkulose.

Einige Autoren sprechen sich viel bestimmter aus. So will Kayser, der Meerschweinchen in die Bauchhöhle Timotheebazillen injizierte, die vollständige Genesung der Tiere nach 3—4 Wochen beobachtet haben. In den entstandenen Tuberkeln fand er keine Riesenzellen. Koizumi injizierte den Kaninchen je 3 Timotheebazilluskulturen intravenös und konnte deren Verschwinden aus dem Blute und den Organen vom 6. Tage an nachweisen. Bondoni P. und Dal Collo, P. G., die mit 4 Stämmen säurefester Bakterien experimentierten, welche von Kalle und dessen Mitarbeitern verwendet wurden, erhielten negative Resultate an Meerschweinchen.

Verhältnismäßig unlängst führten W. Kalle, H. Schloßberger und W. Pfannenstiel Timothee-, Rabinowitsch- und andere säurefeste Bazillen Meerschweinchen in großen Mengen subkutan und intraperitoneal ein und verimpften den Stoff aus den entstandenen Knötchen von neuem auf Meerschweinchen; in anderen Versuchen isolierten sie die Mikroben aus Drüsen und inneren Organen und impften damit wiederum Tiere. Die Autoren sahen histologische

Veränderungen, die eine Tendenz zur Ausbreitung kundgaben, immer mehr und mehr an Ähnlichkeit mit den Tuberkelbazillen gewannen und den Tod der Tiere herbeiriefen. Zugleich wurde die Saprophytenkultur der Tuberkelbazillenkultur ähnlich. Daraus folgerten die Autoren, daß bei dauerndem Verweilen im tierischen Organismus (Meerschweinchen) die Säurefesten Eigenschaften menschlicher Tuberkelbazillen bekommen. Ferner werden von Zlatogoroff, Zechnowirzer und Koschkina Timothee-, L. Rabinowitsch- und Smegma-Stäbchen zwecks Steigerung ihrer Virulenz auf Glycerinbouillon mit Milchsäurezusatz auf avitaminösem Reisnährboden Settis' gezüchtet und nach wiederholten Passagen Meerschweinchen einverleibt. Nur in drei Fällen beobachteten die Autoren eine Virulenzsteigerung, die in der Ausdehnung der Infektion zum Ausdruck kam, jedoch ohne toxämische Erscheinungen. Auch gelang es diesen Autoren nicht, durch Einspritzungen hungernden oder auf avitaminöse Diät gesetzten Tieren den besagten Stämmen pathogene Eigenschaften zu verleihen. Die Autoren leugnen außerdem die Möglichkeit, bei Meerschweinchen durch Einspritzungen normal gezüchteter säurefester Saprophyten Bakteriämie zu erzeugen.

In vorliegender Arbeit verwendeten wir zu unseren Versuchen junge Meerschweinchen (Körpergewicht 150—200 g), weiße Ratten und Mäuse, denen wir große Mengen von Timotheebazillen, deren Stamm in unserem Laboratorium vorhanden ist, intraperitoneal, intrakardial und subkutan einverleibten.

In dieser I. Mitteilung werden die Ergebnisse unserer Untersuchungen an Meerschweinchen dargelegt. Diesen Tieren wurde je eine ganze oder $\frac{2}{3}$ Timotheebazilluskultur injiziert, gewachsen auf 6 ccm Glycerinbouillon im Brutschrank bei 37° C binnen 6—8 Tagen. Die Tiere vertrugen die Einspritzungen sehr gut — mit Ausnahme solcher, die intrakardiale Injektionen erhielten —, wuchsen normal und verloren nicht an Gewicht. Wenn die Tiere nicht getötet wurden, lebten sie viele Monate fort. In manchen Fällen wurden die Tiere bis 8 Monate lang beobachtet. Wir waren bestrebt, klarzulegen: 1) das Schicksal der Timotheebazillen im tierischen Organismus, 2) Wege, Art und Weise der Elimination der Mikroben aus dem Organismus, 3) ob diese Mikroben Bakteriämie hervorrufen, 4) den Charakter der pathologisch-anatomischen Veränderungen, die von dem Timotheebazillus erzeugt werden. Der erste Teil dieser Arbeit ist von W. Jelin, teilweise in Gemeinschaft mit F. Friedmann, ausgeführt, die anderen vom erstgenannten Autor.

Versuch I.

27. 10. 26. 5 Meerschweinchen erhielten intraperitoneal je eine ganze 6tägige Timotheebazillenkultur.

29. 10. 26. Das Meerschweinchen Nr. 1 wurde getötet. Sektionsbefund: Vergrößerte, gegen die Norm verdickte, hyperämische Milz. Hyperämische Leber, Lungen und Nieren. In nach Ziehl gefärbten Ausstrichen aus Bauchhöhlenflüssigkeit, Milz, Leber, Nieren, Lungen, Mesenterialdrüsen große Mengen säurefester Bakterien (in der Milz weniger zahlreich als in den anderen Organen). Ferner bedeutende Mengen derselben Bakterien im Kot und im Abschabsei der inneren Oberfläche des Zwölffinger- und des Dünndarms. Verimpfung auf Glycerinbouillon eines dem Herzen entnommenen Blutropfens und Materials aus der Milz, Leber, aus den Lungen, Nieren, mesenterialen und bronchialen Drüsen. Das Wachstum setzte in allen Fällen vom 7.—25. Tage ab ein.

2. 11. Sektionsbefund beim getöteten Meerschweinchen Nr. 2. Verwachsung des Netzes mit dem Darm, bedeutend vergrößerte Mesenterialdrüsen. An der Leber vier runde, über der Leberoberfläche hervorragende, nadel- und zündholzkopfgroße, gräuliche Knötchen von dichter Konsistenz. Vergrößerte Milz. Leber, Milz, Nieren, Lungen, mesenteriale und bronchiale Drüsen enthalten säurefeste Stäbchen und Körner, aber schon in geringen Mengen. Besonders viel gekörnte Stäbchen und einzelne Körner fanden sich im Präparate aus den Knötchen, die sich mit Mühe zwischen zwei Objektträgern zerdrücken ließen. Im Kot und in den Dünndarmwänden ebenfalls geringe Mengen von säurefesten Mikroben. Verimpfungen aus Herzblut, Milz, Nieren, Leber, Drüsen auf Glycerinbouillon ergaben stets Wachstum nach 9—27 Tagen.

12. 11. Sektionsbefund beim getöteten Meerschweinchen Nr. 3: Verwachsung des Omentum mit dem Darne. Stark vergrößerte Milz, vergrößerte und verdickte Drüsen, hyperämische Lungen. In Ausstrichen aus Milz, Leber, Nieren, Lungen, bronchialen Drüsen, Darmwandung, Kot keine Säurefesten. Präparate aus dem Omentum und den Mesenterialdrüsen wiesen Säurefeste in geringer Zahl auf (5—6 pro 20 Gesichtsfelder). Die Aussaat aus dem Herzblut, der Milz, Leber, aus den Nieren und Lungen auf Glycerinbouillon ergab binnen einem Monat kein Wachstum.

Aus der Analyse des Versuchs Nr. 1 ist zu ersehen, daß in die Bauchhöhle in großen Mengen eingespritzte Timotheestäbchen in alle Organe — Milz, Leber, Nieren, Lungen, bronchiale und mesenteriale Drüsen — eindringen und dort Entzündungsprozesse hervorrufen. Knötchenbildungen bekamen wir auch bei den hier nicht angeführten wiederholten Versuchen lediglich in den Lungen und an der Leber zu Gesicht, nie aber an anderen Organen. Meist werden sie in den Lungen gefunden. Eine ausführlichere Schilderung der pathologisch-histologischen Veränderungen der Organe bleibt für die II. Mitteilung aus dieser Arbeit vorbehalten; hier beschränken wir uns auf das pathologisch-anatomische Charakteristikum.

Was das Schicksal der in die Bauchhöhle eingeführten Mikroben betrifft, so zeigt dieser Versuch, daß sie in die Blutbahn gelangen, d. h. eine Bakteriämie verursachen, zwar keine bedeutende, da wir aus einem Blutstropfen auf Glycerinagar nicht mehr als 2—3 Kolonien erhalten konnten. Ein Teil der Bazillen wird durch die Darmwandungen eliminiert, die meisten gehen aber in den Organen zugrunde. Zeit des Zugrundegehens in den Organen 6—15 Tage; am schnellsten zerfallen sie in der Milz. In den mesenterialen Drüsen und im Netze sind immerhin noch am 15. Tage nach der Injektion säurefeste Bazillen und Körner zu sehen, die sich aber am 29. Tage nicht mehr konstatieren lassen. Obzwar es im letzten Falle nicht gelingt, bakterioskopisch und bakteriologisch das Vorhandensein von säurefesten Mikroben in den Organen nachzuweisen, so werden doch mehrere Tage nach dem Verschwinden der Stäbchen und Körner aus den Organen Knötchen konstatiert, wobei die Milz vergrößert und die Organe hyperämisch bleiben.

Versuch II.

8. 1. 27. 5 Meerschweinchen Nr. 6—10 erhielten intrakardial je $\frac{2}{3}$ 6tägiger Timotheebazilluskultur, 2 Meerschweinchen Nr. 11 und 12 je $\frac{1}{2}$ -Kultur.

10. 1. Das Meerschweinchen Nr. 8 ist gestorben. Sektionsbefund: Etwa um das Zweifache vergrößerte Milz, Lungen-, Leber-, Nierenhyperämie. Bakterioskopisch werden in allen diesen Organen und in den Wänden des Dünndarms säurefeste Bazillen in geringer Zahl festgestellt. Die Abimpfung mit Herzblut und Material aus den Organen ergab durchweg Wachstum nach 10—23 Tagen.

12. 1. Zugrundegegangen ist das Meerschweinchen Nr. 7. Die Lungen sind ganz mit nadelkopfgroßen Tuberkeln bedeckt. Um das 2—3fach vergrößerte Milz. Leber-, Nierenhyperämie. In Ausstrichen aus Leber, Lungen, Nieren, Milz säurefeste, teilweise sich schlecht nach Ziehl färbende, zernagte Stäbchen; besonders häufig kommen in Präparaten aus den Lungen zahlreiche sehr lange säurefeste Bakterien vor. Das aus den Organen abgeimpfte Material ergab durchweg Wachstum am 8.—19. Tage. Blut ergab kein Wachstum.

16. 1. Zugrundegehen des Meerschweinchens Nr. 6. Sektionsbefund: Um das 3—4fache vergrößerte Milz, dichter Konsistenz. Bakterioskopisch: In den Lungen sehr kleine Gruppen säurefester Stäbchen, in der Leber Anhäufungen von rotem Detritus, wo größere, einzelne rote Körner wahrnehmbar sind. In Ausstrichen aus Milz, Nieren, Drüsen keine Säurefesten, ebenso wie in den Dünndarmwänden und im Kot. Verimpfungen aus Blut und Organen auf Glycerinbouillon hat mit Ausnahme des Materials aus den Lungen kein Wachstum ergeben.

22. 1. Meerschweinchen Nr. 9 wird getötet. Sektionsbefund: Die Lunge ist von einer sehr großen Menge graulicher, nadelkopfgroßer Knötchen von dichter Konsistenz durchsetzt. Um das 3—4fache vergrößerte, kompakte Milz, hyperämische Nieren und Leber, vergrößerte und indurierte bronchiale Drüsen. Bakterioskopisch gelang es mit großer Mühe, einzelne rot gekörnte Stäbchen in einigen von den Knötchen in den Lungen zu finden; in der Milz, Leber, in den Nieren, den mesenterialen Drüsen, den Dünndarmwänden, im Kot fehlen Säurefeste. Abimpfung aus den Organen ergab auf Glycerinbouillon kein Wachstum.

12. 4. Getötet wurden die Meerschweinchen Nr. 10, 11, 12. Bei allen vergrößerte Milz, gelbliche Leber; an den Lungen wechseln marmoriert-grauliche mit weißen Partien ab. Weder bakterioskopisch noch kulturell ließen sich Säurefeste nachweisen.

Die Ergebnisse des Versuches II sind annähernd denen des Versuchs I gleich. Von 7 Meerschweinchen sind 3 bald nach der Injektion innerhalb von 2—8 Tagen

zugrunde gegangen, was sich dadurch erklärt, daß die in großen Mengen in die Lungen gelangenden Mikroben akute Entzündungserscheinungen hervorgerufen. Die am Leben gebliebenen Tiere verhielten sich ganz normal, und die 3 letzten wurden 3 Monate nach der Injektion in gutem Zustande getötet. Die Mikroben verschwanden aus verschiedenen Organen im Zeitraume von 4—14 Tagen, wobei sie sich am längsten in den Knötchen an den Lungen aufhielten. Wir konstatierten hier wie im ersten Versuche die Elimination der Mikroben durch den Darm; die meisten zerfallen jedoch in den Organen. Zugleich sahen wir, daß die Mikroben in allen parenchymatösen Organen Entzündungserscheinungen hervorriefen, die, nachdem die Mikroben sich schon weder bakterioskopisch noch kulturell nachweisen ließen, noch fort dauerten: 3 Monate nach der Injektion war die Milz noch stark vergrößert und die Leber und Lungen verändert.

Versuch III.

13. 1. 27. Meerschweinchen Nr. 13—16 erhielten subkutan je $\frac{2}{3}$ einer 6tägigen Timotheebazillenkultur.

20. 1. Getötet wurde Meerschweinchen Nr. 13. Walnußgroße Geschwulst an der Injektionsstelle, keine Fistel. Steriler Hautschnitt an der Geschwulst. Dicker, solchem in tuberkulösen Geschwülsten ähnlicher Eiter. Färbung nach Ziehl hat viel säurefeste Stäbchen und Körner gezeigt, die bei Verimpfung auf Bouillon eine typische Timotheebazilluskultur ergab. Sektionsbefund: Vergrößerte Milz, Leber, Lungen hyperämisch. In Ausstrichen aus Milz, Nieren fehlen Säurefeste; einzelne rote Stäbchen finden sich in den Dünndarmwänden und in der Leber, Anhäufungen von Säurefesten in den Lungen. Abimpfungen auf Glycerinbouillon aus dem Blut ergibt Wachstum nach 17 Tagen, aus der Leber und den Lungen nach 12 bis 15 Tagen.

27. 1. Getötet wurde das Meerschweinchen Nr. 14. Abszeß an der Injektionsstelle; aus dem Einschnitt dicker Eiter, in dem sich mikroskopisch nachweisen lassen: 1) Anhäufungen von säurefesten Stäbchen, 2) von roten Körnern, 3) von rotem Detritus, in dem einzelne mehr oder weniger grobe Körner sichtbar sind. Sektionsbefund: vergrößerte Milz, hyperämische Nieren; vergrößerte und indurierte bronchiale Drüsen. In den Lungen stellenweise einzelne grauliche Knötchen von dichter Konsistenz; in den Lungen und Knötchen lassen sich mit Mühe einzelne säurefeste Stäbchen konstatieren. Wachstum auf Glycerinbouillon nur aus Lungenmaterial.

8. 2. Getötet wurde das Meerschweinchen Nr. 15. Unter der Haut eine walnußgroße Geschwulst an der Injektionsstelle; keine Fistel. Aus dem Einschnitte dicker Eiter. Im Eiterausstrich Anhäufungen von roten Körnern, Detritus mit einzelnen Körnern. Sektionsbefund: Stark (um das 3—4fache) vergrößerte kompakte Milz. Markant vergrößerte und verdickte bronchiale Drüsen. In den Lungen stellenweise graue Partien. In Organausstrichen keine Säurefesten. Aussaat auf Glycerinbouillon blieb resultatlos.

5. 3. Meerschweinchen Nr. 16. Getötet. Keine Geschwulst an der Injektionsstelle. Sektionsbefund: Stark vergrößerte kompakte Milz. In den Lungen wechseln grauliche Partien mit normalem Lungengewebe ab. Vergrößerte und verdickte bronchiale Drüsen. Bakterioskopisch und kulturell ließen sich keine Säurefeste nachweisen.

Aus dem Versuche III geht hervor, daß 1) subkutan injizierte Timotheebazillen an der Injektionsstelle eine Abszeßbildung hervorrufen, wobei der Eiter dem bei Tuberkulose ähnelt, aber etwas dünner und stellenweise hellbraun gefärbt ist. 2) An der Injektionsstelle entsteht spontan keine Fistel, und es kommt zur Resorption des Abszesses. Die Timotheebazillen halten sich im Eiter unter der Haut bei weitem länger auf als in den Organen, und man kann sie hier noch einen Monat nach der Injektion auffinden. Aus der Einspritzungsstelle treten die Mikroben ins Blut und gelangen in alle Organe, wo sie Entzündungserscheinungen auslösen. Im Eiter findet ein Zerfall der Stäbchen in säurefeste Körner und ferner in säurefesten Detritus statt, der bald verschwindet.

Die ersten 3 Versuche ermöglichten uns die Beobachtung der Zeit, innerhalb der Timotheebazillen aus dem Organismus des Meerschweinchens verschwinden und zeigten uns auch, daß hier ein pathologischer Prozeß vor sich geht, der sogar nach dem Verschwinden der Mikroben aus dem Organismus fort dauert. Mit besonderer Evidenz war das an den 3 Monate nach der In-

jektion getöteten Meerschweinchen Nr. 10, 11, 12 zu sehen. Die zwei anderen Versuche weisen auf Veränderungen im Organismus hin, die nach einer weitaus längeren Zeit immer noch bestanden.

Versuch IV.

17. 12. 26. Es erhielten 4 Meerschweinchen Nr. 17—20 intraperitoneal je 1 Kultur des *Timotheebazillus*.

1. 2. 27. Das Meerschweinchen Nr. 17 wird getötet. Sektionsbefund: Stark, etwa um das 3—4fache gegen die Norm vergrößerte Milz, gelblich gefärbte Leber, an den Lungen abwechselnd graue und von normalem Gewebe Partien. Bakterioskopisch und durch Abimpfung von Blut und Material aus den Organen auf Glycerinbouillon gelang es nicht, Säurefeste nachzuweisen.

17. 4. 27. Das Meerschweinchen Nr. 18 wird getötet. Sektionsbefund: Ungemein große, etwa um das 5fache vergrößerte Milz. Deutlich gelbgefärbte vergrößerte Leber. Mikroskopisch wenig veränderte Nieren. Bronchiale Drüsen vergrößert und verdickt. An den Lungen durchsichtig graue Partien. Die Färbung nach Ziehl zeigt im Blute und in den Organen keine säurefesten Elemente. Abimpfung von Blut und Material aus den Organen ergab auf Glycerinbouillon kein Wachstum.

10. 5. Meerschweinchen Nr. 19 wurde getötet. Dieselben Erscheinungen wie beim Meerschweinchen Nr. 18. Weder mikroskopisch noch kulturell konnten Säurefeste im Blute und in den Organen nachgewiesen werden.

22. 6. Meerschweinchen Nr. 20 wurde getötet. Sektionsbefund: Die um das 3—4fache im Vergleich zur normalen vergrößerte Milz ist hyperämisch, induriert und mit den unteren Rippen des Brustkorbs derart verwachsen, daß sie beim Trennungsversuche zerriß. An den Lungen dieselben Erscheinungen wie bei Nr. 18, jedoch mehr diffus. Die gelbliche Leber ist vergrößert. Auffallend vergrößerte mesenteriale und bronchiale Drüsen dichter Konsistenz. Bakterioskopisch konnten keine Säurefesten in Milz, Leber, Nieren, Lungen, Drüsen nachgewiesen werden. Abimpfung mit Blut und Material aus den Organen und Drüsen auf Glycerinbouillon ergab kein Wachstum.

Versuch IV ist sehr instruktiv. Nr. 18 und 19 wurden ungefähr nach 4 Mon. und 20 Tagen, Nr. 20 nach 6 Mon. und 5 Tagen getötet. Weder im Blute noch in den Organen konnten *Timotheebazillen* aufgefunden werden, dessen ungeachtet aber wiesen die Organe sogar makroskopisch tiefe Veränderungen auf. Die Milz war bei allen getöteten Tieren stark vergrößert, kompakt und in einem Falle sogar mit dem Brustkorbe verwachsen. Bei der Leber lag offensichtlich eine Fettdegeneration vor. Die Drüsen (der Bronchien und des Mesenteriums) waren stark vergrößert und verdickt. Besonders auffällige Aenderungen boten aber die Lungen, in denen irgend ein chronischer Prozeß vor sich ging, welcher um so schärfer ausgesprochen war, je später das Tier getötet wurde. All das weist darauf hin, daß im Organismus des Meerschweinchens sich ein gewisser pathologischer Prozeß abspielt, ungeachtet dessen, daß die Mikroben verhältnismäßig bald weder bakterioskopisch noch kulturell nachweisbar werden.

Versuch V.

19. 10. 26. Meerschweinchen Nr. 21—25 erhielten intraperitoneal je $\frac{1}{6}$ einer 6tägigen *Timotheebazilluskultur*.

21. 4. 27. Nr. 21 und 22 werden getötet. Sektionsbefund: Die Milz ist 3—4mal größer als in der Norm. Die Leber ist vergrößert, gelblich gefärbt. An den Lungen; stellenweise dunkelgraue, teilweise durchsichtige Partien. Auffällig vergrößerte bronchiale Drüsen dichter Konsistenz. Bakterioskopisch in den Organen keine Säurefesten. Aussaat aus Blut und Organen auf Glycerinbouillon hatte kein Wachstum zur Folge.

15. 6. 27. Meerschweinchen Nr. 25 ist gestorben, am 23. 6. Nr. 23 und 24. Sektionsbefund: Dieselben Erscheinungen wie bei Nr. 21 und 22, jedoch ist der Prozeß in den Lungen noch auffälliger ausgesprochen. Sie sind fast durchgehends dunkelgrau mit hie und da wahrnehmbaren grauen Partien. Bei allen Meerschweinchen auffällig vergrößerte und kompakte Milz. Vergrößerte Leber.

Die Ergebnisse des Versuches V sind diese: Erstens bewirken nicht bloß große Mengen von *Timotheebazillen*, sondern auch verhältnismäßig geringe, wie wir sie beim letzten Versuche verwendeten, gleiche Veränderungen. Andererseits gingen die Meerschweinchen nach mehr als 8 Mon. zugrunde, d. h.

der im Organismus des Tieres nach der Einspritzung von Timotheebazillen entstandene Prozeß führt letzten Endes den Tod herbei. Wir haben dies zwar nur bei 3 Meerschweinchen beobachtet, jedoch zeigte ihre sorgfältige Untersuchung, daß hier keine andere sich zugesellende Infektion vorlag. Auch hier konnten wir in den Organen und im Blute der Tiere keine säurefesten Mikroben konstatieren.

Abgesehen von dem Gesagten sind die mit Timotheebazillen infizierten Tiere sonst nach ihrem Äußeren nahezu normal, verlieren fast nichts an Körpergewicht; das bezieht sich auch auf die zugrundegegangenen Tiere.

Wir wollen uns nun zur allgemeinen Betrachtung der gewonnenen Resultate wenden. Die in den Organismus des Meerschweinchens eingeführten Timotheebazillen rufen, unabhängig von der Art und Weise der Einverleibung, eine in den ersten Tagen nach der Injektion besonders deutlich ausgesprochene Bakteriämie hervor, die 5—7 Tage anhält. Durch die Blutbahn gelangen die Mikroben in die Organe, ein Teil wird durch die Dünndarmwände in den Darm eliminiert. Subkutan eingespritzt, veranlassen die Timotheebazillen die Bildung eines Abszesses, dessen Eiter dem bei Tuberkulose ähnlich, aber etwas dünnflüssiger ist; im Gegensatz zur Tuberkulose beobachteten wir hier nie eine Fistel, der Eiter wird allmählich resorbiert. In den inneren Organen ruft die Einverleibung des Timotheebazillus starke Entzündungserscheinungen hervor mit Bildung in den Lungen und seltener in der Leber grauer Knötchen, die nie käsigen Zerfall oder Eiterung erfahren. Die Milz erfährt eine starke Vergrößerung und verwächst bisweilen mit den naheliegenden Geweben; in der Leber geht eine Fettdegeneration vor sich (worin wir uns auch durch pathologisch-histologische Untersuchungen überzeugen konnten), die Nieren erscheinen ebenfalls entzündet. Der Prozeß nimmt einen chronischen Verlauf, wobei die Milz die ganze Zeit hindurch vergrößert bleibt und die Lungen auffällige Veränderungen erleiden — eingehend werden wir darüber in der II. Mitteilung berichten —, die offenbar durch entzündliche Erscheinungen charakterisiert werden.

Letzten Endes kommt es nach mehreren Monaten (8—10) zum Exitus, wobei die Tiere weder sichtbar abmagern noch an Gewicht verlieren. Der hier von uns geschilderte chronisch entzündliche Prozeß verläuft im Organismus innerhalb mehrerer Monate, nachdem schon beim Meerschweinchen weder bakterioskopisch noch bakteriologisch Säurefeste nachweisbar sind. Diese verschwinden aus verschiedenen Organen zu verschiedener Zeit. Zunächst werden die Mikroben in der Milz vermißt, wo sie bakterioskopisch und kulturell nur in den ersten 5—7 Tagen nach der Injektion nachweisbar sind, am längsten — mitunter bis 14 Tage — bleiben sie von den parenchymatösen Organen in den Lungen. Hingegen sind die Mikroben im Netze und in den mesenterialen Drüsen, intraperitoneal einverleibt, über 25 Tage nachweisbar und subkutan im Eiter über einen Monat. Im letzteren Falle läßt sich der Zerstörungsprozeß des Timotheebazillus leicht verfolgen: die Stäbchen wandeln sich in Körner um, die wieder in Detritus übergehen, welcher dann verschwindet. Jedenfalls ruft ein Mikrob, der bisher für einen Saprophyten galt, einen chronischen Prozeß hervor, wobei der Mikrob selbst verhältnismäßig schnell aus dem Blute und den Organen verschwindet. Hier stoßen wir auf eine eigenartige, bisher noch vollständig unerforschte Erscheinung. Jedenfalls ruft ein Mikrob, der bisher für einen Saprophyten galt, eine unzweideutige Infektion hervor, wobei er sich in eine unsichtbare Form umwandelt. Der nachstehende Versuch wirft einiges Licht auf diese interessante Erscheinung.

Versuch VI.

2. 11. 26. 5 Meerschweinchen Nr. 26—30 erhielten intraperitoneal je $\frac{2}{3}$ einer sechstägigen durch 5 Minuten langes Kochen abgetötete Timotheebazilluskultur.

4. 11. Meerschweinchen Nr. 26 wird getötet. Sektionsbefund: Vergrößerte Milz. Hyperämische Organe. In der Milz und der Leber eine unbedeutende Anzahl von säurefesten Körnern und Stäbchen, im Netz bei weitem mehr. In den Lungen keine Mikroben.

8. 11. Meerschweinchen Nr. 27 wird getötet. An der Leber vier graue nadelkopfgroße Knötchen. Vergrößerte Milz. Hyperämische Leber und Nieren. Säurefeste in der Leber, dem Netze, den mesenterialen Drüsen; sie fehlen in den Lungen.

12. 11. Meerschweinchen Nr. 28 wird getötet. Vergrößerte Milz. Hyperämische Lungen. Säurefeste lediglich im Netz und den mesenterialen Drüsen.

27. 11. Meerschweinchen Nr. 29 wird getötet. Makroskopisch sind Milz vergrößert, Nieren normal. Säurefeste wurden nur im Netz in geringer Menge gefunden.

12. 12. Meerschweinchen Nr. 30 wird getötet. Säurefeste wurden nirgends nachgewiesen. Lungen fast normal, Leber gelblich, Milz vergrößert.

Versuch VI zeigt, daß abgetötete Timotheebazillen, intraperitoneal injiziert, Entzündungserscheinungen hervorrufen, die mit der Bildung einzelner Knötchen in der Leber und mit der Vergrößerung der Milz einhergehen. Die anfänglich hyperämischen Lungen kehren zur Norm zurück. Zugleich läßt sich ein durchaus bestimmter Unterschied bei der Einverleibung von abgetöteten Mikroben beobachten. Obwohl die durch abgetötete Mikroben hervorgerufenen Veränderungen vollkommen denjenigen gleichen, die durch lebende Keime erzeugt werden, so findet doch bei der Einverleibung der ersteren eine verhältnismäßig schnelle Restitutio ad integrum der Lungen statt, d. h. diese Organe nehmen ihr früheres Aussehen an, während bei der Einführung von lebenden Timotheebazillen ein mehrere Monate hindurch, auch nach dem Verschwinden der Keime, fortdauernder chronischer Prozeß beobachtet wird.

Schlußfolgerungen.

Dem Organismus des Meerschweinchens einverleibte Timotheebazillen rufen Bakteriämie hervor, indem sie sich von der Injektionsstelle aus im ganzen Organismus verbreiten. Ein Teil der Stäbchen wird durch den Darm eliminiert, die anderen zerfallen in den Organen, wo sie Entzündungserscheinungen auslösen. — 2) Die Timotheebazillen werden bakterioskopisch und kulturell nicht mehr konstatiert: im Blut nach 5 Tagen, in der Milz und den Nieren etwa nach 5—7 Tagen, in der Leber nach 6—8 Tagen. In den Lungen kann man sie bisweilen nach 8—14 Tagen finden; am längsten halten sie sich im Netze und in den mesenterialen Drüsen bis zu 25 Tagen auf. Unter der Haut aber lassen sie sich an der Injektionsstelle im Eiter noch nach einem Monat nachweisen. — 3) Unter der Haut an der Injektionsstelle rufen die Timotheebazillen die Bildung von Eiter hervor, der dem bei Tuberkulose ähnelt; Fisteln werden aber nie beobachtet, der Eiter wird allmählich resorbiert. — 4) Die Timotheestäbchen lösen in den parenchymatösen Organen beim Meerschweinchen Entzündungserscheinungen aus, die mit der Bildung von Knötchen in den Lungen und der Leber einhergehen. Die Milz ist dabei stark vergrößert und kompakt. Die Leber bekommt schon 1½ Mon. nach der Injektion eine gelbliche Färbung. Die besagten Erscheinungen dauern noch viele Monate fort, obwohl die Mikroben weder bakterioskopisch noch kulturell nachgewiesen werden können. Die Milz bleibt die ganze Zeit über vergrößert. Besonders markante Veränderungen gehen in den Lungen vor. — 5) Abgetötete Timotheebazillen lösen ebenfalls Entzündungserscheinungen aus, die vollkommen denen gleichen, welche in den ersten Tagen nach der Ein-

verleibung von lebenden Mikroben beobachtet werden. Der Prozeß in den Lungen klingt aber schnell ab, während er beim Injizieren von lebenden Mikroben sich weiter verstärkt.

Literatur.

- 1) Möller, A., Dtsch. med. Wochenschr. 1898. Nr. 24. — 2) Potet, Le paratub. bacill. 1902. (Zit. nach Zlatogoroff, Zechnowitzer und Koschkina, Ztschr. f. Hyg. Bd. 105. S. 583.) — 3) Lubarsch, Ztschr. f. Hyg. 1899. — 4) Rode et Calvielle, Internat. Tuberkulosekongr. Paris 1905. — 5) Freymuth, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 29. — 6) Zechnowitzer, Trudij Obst. Isp. Pric. pri Charkow. Univ. 1913. — 7) Hölscher, Münch. med. Wochenschr. 1901. Nr. 3. — 8) Abbot et Gildessleven, Univ. of Pennsilv. Med. Bull. — 9) Courmont et Reseos, Compt. rend. Soc. de Biol. 1902. p. 1954. — 10) D'Amore, Giorn. Intern. de la Soc. de Biol. 1906. — 11) Kayser, Inaug.-Diss. Rostock 1902. (Zit. nach Zlatogoroff, Zechnowitzer und Koschkina.) — 12) Koizumi Toru, Ztschr. f. Immunitätsf. 1924. — 13) Bondoni, P., et Dal Collo, P. G., Klin. Wochenschr. 1923. S. 1504. — 14) Kolle, W., Schloßberger und Pfannenstiel, W., Dtsch. med. Wochenschr. 1921. S. 937. — 15) Zlatogoroff, Zechnowitzer und Koschkina, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 105. S. 583.

Nachdruck verboten.

Ueber das Vorkommen von Wutvirus im Gehirn schutzgeimpfter gesunder Tiere.

I. Mitteilung.

[Aus der Lehrkanzel für Bakteriologie der Tierärztlichen Hochschule in Wien
(Vorstand Prof Dr. Josef Schnürer).]

Von Assistent Dozent Dr. med. vet. **Hans David.**

Quast berichtete vor einiger Zeit, daß es ihm gelungen ist, Virus fixe im Gehirn eines postinfektionell geimpften, interkurrent gestorbenen Mannes nachzuweisen; er legte sich die Frage vor, ob das Vorkommen von Virus fixe im Gehirn Schutzgeimpfter konstant wäre. Nach Versuchen an gesunden Hunden, hält es Quast in hohem Grade für wahrscheinlich, daß das durch die Impfung subkutan einverlebte Virus seinen Weg in das Zentralnervensystem nimmt, sich dort eine Zeitlang latent hält und dann allmählich abgebaut wird; ein Vorgang, der vielleicht eine Erklärung für den Immunisierungsvorgang bei Lyssa abgeben könnte. Lubinski und Prausnitz schließen aus diesen Versuchen, „daß das Virus fixe sich normalerweise im Gehirn der Immunisierten aufhält.“ Wenn nun diese Behauptung allgemein zu recht besteht, dann würden durch die präinfektionelle Immunisierung von Hunden mit lebenden Virus fixe Virusträger geschaffen; ein Umstand, der gegen die Einführung der Wutschutzimpfung von Hunden mit lebenden Virus fixe sprechen würde, weil eine Virusausscheidung durch gesunde Wutvirusträger, obwohl noch nicht bekannt, immerhin möglich wäre. Seitdem mein Chef, Prof. Dr. Schnürer, Lyssa-versuche anstellt, dies ist seit mehr als 20 Jahren, wurde stets das Gehirn von immunisierten und interkurrent gestorbenen Hunden oder wegen Abbruch des Versuches getöteter Tiere auf Infektiosität geprüft. In keinem Falle erzeugte das Gehirn von solchen Tieren bei Kaninchen nach intrazerebraler Einverleibung Lyssa, wie dies auch andere Autoren für ihre Versuchstiere angeben. So ist den Versuchsprotokollen von Giese zu entnehmen, daß das Gehirn interkurrent gestorbener, mit Virus fixe vorbehandelter Hunde 5, 6 und 22 Tage

nach der Impfung für Kaninchen nicht infektiös gewesen war (siehe Versuch 1: Hund 1, Versuch 4a: Hund 19, Versuch 4b: Hund 5) Mießner und Baars prüften speziell die Frage der Uebertragung der Tollwut durch mit Virus fixe geimpfte Hunde und sie kamen zu dem Ergebnis, daß von wutschutzgeimpften Hunden weder der Biß, noch der Speichel und das Gehirn infektiös ist.

Quast gibt nun an, daß die Virusmenge im Gehirn vorbehandelter Hunde oftmals sehr gering ist und erst nach Verimpfung von größeren Mengen Gehirnmateriales auf Kaninchen nachweisbar ist. Obwohl in Oesterreich seit mehr als 2 Jahren die präinfektionelle Immunisierung von Hunden gegen Lyssa nur mit Impfstoffen vorgenommen wird, die sich nach subduraler Verimpfung auf Kaninchen und 1 monatlangem Beobachtung der Tiere als avirulent erweisen (Impfstoff nach Umeno und Doi, in letzter Zeit nach Mullford), so interessierte uns doch die Frage, ob nach einer subkutanen Injektion von frischem Virus fixe „Wien“ das Virus im Gehirn von Hunden nachweisbar wäre, wenn bei der Prüfung auf Infektiosität den Kaninchen eine größere Menge Hundehirn (0,15ccm 1:5 verd.) einverleibt wird. Die Versuche, ausgeführt mit 5 Hunden und 8 Meerschweinchen sind aus folgender Tabelle ersichtlich:

	Impfung	Getötet ... Tage nach der Impfung	Anmerkung
Hund I, 9 kg	V. f. „Wien“ 1,0 g subkutan beiderseits Lendenwirbelsäule 31. 1. 26	4. 2. 26, 4 Tage	Zur Virulenzkontrolle des verwendeten Virus fixe wurde dieses stets gleichzeitig mit den Hunden und den Meerschweinchen auf ein Kaninchen überimpft
Hund II, 6 kg	wie Hund I	10. 2. 26, 10 Tage	
Hund III, 7 kg	wie Hund I	28. 2. 26, 28 Tage	
Hund IV, 8 kg	20. 3. 26, 2,0 g Virus fixe wie oben	28. 3. 26, 8 Tage	Die ganze Medulla obl., beide Ammonshörner, Teile der Hirnrinde und des Rückenmarkes nahe der Injektionsstelle, 1:5 mit phys. Kochsalzlösung verrieben und 0,15 ccm auf je 2 Kaninchen überimpft (intrazerebral)
Hund V, 7 kg	20. 3. 26, 2,0 g Virus fixe wie oben	3. 4. 26, 14 Tage	
Meerschw. I, II	Die Meerschweinchen erhalten am 4. 4. 26 je 0,5 g Virus fixe „Wien“ subkutan am rechten Innenschenkel	8. 6. 26, 4 Tage	Von den Meerschweinchen wurde eine Gehirnhälfte, die Medulla und das ganze Rückenmark 1:5 mit phys. Kochsalzlösung verrieben und davon ebenfalls 0,15 ccm auf je 2 Kaninchen pro Meerschweinchen intrazerebral verimpft
III, IV		14. 6. 26, 10 Tage	
V, VI		22. 6. 26, 18 Tage	
VII, VIII		30. 6. 26, 26 Tage	

Im Verlaufe von 8 Monaten erkrankte keines der mit den Gehirnen der Hunde und der Meerschweinchen gespritzten Kaninchen. Da bei den intrazerebralen Injektionen rund 0,03 g, d. i. 30 mg Nervensubstanz den Kaninchen einverleibt worden sind, so kann der negative Ausfall der Ueberimpfungen wohl nicht auf eine zu geringe einverlebte Menge zurückgeführt werden. (Minimaldosen für Virus fixe dürften je nach den verschiedenen Virusstämmen mit 0,002—0,3 mg angenommen werden können). Das Verimpfen noch größerer Hundegehirnmengen auf Kaninchen als der von uns verwendeten Dosen kann, wie folgender Versuch zeigt, zu unklaren Ergebnissen führen. Ein 4 Wochen alter vollkommen gesunder Hund, der nie mit Virus fixe vorbehandelt worden war und aus einem staupefreien Bestande herstammte, wurde mittels Genickschlag getötet, Gehirnteile im Verhältnis 1:3 mit physiologischer Kochsalzlösung verrieben und 0,15 ccm sofort an 3 Kaninchen intrazerebral verimpft (6. 8. 26).

2 Kaninchen blieben dauernd gesund, während das 3. Kaninchen am 12.—14.8.26 (also 6 Tage nach der Impfung) schwere Lähmungserscheinungen zeigte und am 15. 8. 26 (9 Tage nach der Impfung) unter Symptomen starb, die vollkommen einer Virus fixe-Infektion glichen. Der pathologisch-anatomische Befund, die bakteriologische Untersuchung und die Verimpfung des Gehirns dieses Kaninchens auf 2 weitere Kaninchen waren vollkommen negativ.

Wie die Versuche zeigen, war in keinem Falle das mittels einer einzigen Injektion Hunden und Meerschweinchen einverleibtes Virus fixe „Wien“ im Gehirn und Rückenmark der Tiere nachzuweisen. Da die Prüfungskaninchen nicht mehr steigerungsfähige Dosen von Nervensubstanz einverleibt erhalten hatten (Giftigkeit des normalen Hundehirns für Kaninchen) können wir behaupten, daß in unseren Fällen das auch in großen Dosen den gesunden Körper mit einer subkutanen Injektion einverleibte Virus fixe „Wien“ nicht im infektiösem Zustande im Zentralnervensystem aufgestapelt worden ist.

Was nun den verschiedenen Ausfall unserer Versuche und der Versuche von Quast anlangt, so dürften als Ursache verschiedene Faktoren in Betracht kommen. Es könnte vermutet werden, daß der eine Faktor vielleicht in dem von Quast verwendeten Virus fixe „Stamm Breslau“ liegt, weil nach den Angaben von Quast, Giese, Mießner und Baars zu schließen, der „Stamm Breslau“ in einigen wesentlichen Eigenschaften von dem Wienerstamm abweicht (kürzere Inkubationszeit, verhältnismäßig häufiges Entstehen von Impfwut bei Hunden nach subkutaner Einverleibung von Dosen, welche bei Verwendung von „Wiener-virus“ ohne Schaden vertragen werden, hohe Pathogenität für Kaninchen nach subkutaner Einspritzung, höhere Resistenz gegenüber chemischen und physikalischen Einflüssen, z. B. Phenol, Trocknung).

Da aber Giese, Mießner und Baars mit dem gleichem Virus fixe ihre Versuche anstellten wie Quast; nach unseren Versuchen und nach den Versuchsprotokollen Gieses das subkutan einverleibte Virus am 4., 5. (Giese), 6. (Giese), 8., 10., 14., 22. (Giese), 26., 28. Tag nach der Injektion nicht nachzuweisen war, wir ebenso wie Quast große Dosen von Gehirnmateriale übertragen hatten, so kann wohl angenommen werden, daß weder der verwendete Virus fixestamm, noch die Technik (Einverleibung zu geringer Dosen von Gehirnmateriale auf Kaninchen) oder ein zu spät gewählter Zeitpunkt der Prüfung der Gehirne auf Infektiosität für den negativen Ausfall der Uebertragungsversuche verantwortlich gemacht werden können. Es bleibt daher nur übrig, auf die einzelnen Immunisierungsmethoden zu achten. Während nämlich Giese, Mießner und Baars und wir das Virus fixe mittels einer einzigen Injektion einverleibten, wählte Quast für seine Versuche ein prolongiertes Verfahren, welches aus 20 Einzelinjektionen besteht. Es ergibt sich daher die Notwendigkeit, auf diesen Umstand zu achten und zu überlegen, ob nicht durch die oftmalige Einverleibung von Virus fixe eine Disposition für das Haftenbleiben des Wutvirus im Zentralnervensystem geschaffen werden kann. Ob nun die folgenden Erwägungen, welche wir uns als Arbeitshypothese zurechtgelegt haben, richtig sind, muß selbstverständlich erst der Versuch ergeben.

Aus zahlreichen Versuchen verschiedener Autoren ist bekannt, daß parenteral einverleibte artfremde Nervensubstanz von Versuchstieren oftmals schlecht vertragen wird. Koritschoner und Schweinburg zeigten, daß die oftmalige Einverleibung von gesundem Rückenmark vom Menschen bei Kaninchen Krankheitserscheinungen auslöst, welche den postvakzinalen Lähmungen des Menschen entsprechen. Die histologischen Befunde, welche die beiden Autoren erhielten, sind nun in mancher Beziehung den Veränderungen ähnlich, welche Armand-Delille als Folge einer Neurotoxinvergiftung bei Versuchstieren beschreibt. Babes und Pitulescu fanden im Serum schutz-

geimpfter Personen 6—8 Tage nach Beginn der Behandlung Abwehrfermente gegen Kaninchenhirn und Rochaix und Durand geben an, daß im Serum eines am 15. Tage der Wutschutzimpfung an Myelitis Erkrankten Abwehrfermente nachzuweisen waren, welche gegen die Hirnsubstanz von Kaninchen, Menschen und Hunden gerichtet sind. In diesem Zusammenhange sind auch die Angaben von Witebski und Steinfeld von Bedeutung, nach welchen bei der Immunisierung mit Hirnsuspensionen Lipoidantikörper entstehen, welche organspezifisch aber nicht artspezifisch sind. Es wäre mithin mit der Möglichkeit zu rechnen, daß bei der wiederholten Impfung von Hunden mit Kaninchenhirn zytotoxische Substanzen auftreten, welche gegen Hundennervensubstanz gerichtet sind. Trifft diese Annahme zu, so könnte es durch die zytolytischen Substanzen zu einer Schädigung des Zentralnervensystems des Geimpften kommen und mithin ein *Locus minoris resistentiae* für das *Virus fixe* geschaffen werden können, der nach unserer Arbeitshypothese nicht entsteht, wenn die Immunisierung nur mittels einer Injektion vorgenommen wird.

Durch Versuche soll infolgedessen nachzuweisen versucht werden, ob die auf viele Tage verteilte Vorbehandlung von Hunden mit Kaninchenpassagehirn eine Ursache des Haftenbleibens des *Virus fixe* im Zentralnervensystem sein kann oder nicht.

Weiteres soll untersucht werden, ob durch eine prolongierte Vorbehandlung von Tieren mit artfremder, normaler Nervensubstanz und nachträglicher subkutaner Einverleibung von *Virus fixe* eine Aenderung der Dosis tolerata für diese Tiere eintritt.

Literatur.

Quast, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 97. 1926. — Mießner u. Baars, Ebenda. Bd. 101. 1927. — Giese, Arb. a. d. Reichsgesundheitsamt. Bd. 75. 1926. — Lubinski u. Prausnitz, Weichardts Ergebn. Bd. 8. 1926. — Kraus, Gerlach u. Schweinburg, Lyssa bei Mensch und Tier. Wien. 1926. — Koritschoner u. Schweinburg, Ztschr. f. Immunitätsf. Bd. 42. 1925. — Armand-Delille, zit. nach Graetz, Weichardts Ergebn. Bd. 6. 1924. — Witebski u. Steinfeld, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 104. 1927. Beih. — Rochaix u. Durand, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 67. 1919.

Nachdruck verboten.

Zur Frage des Vorkommens von *Virus fixe* im Gehirn bei der Antirabiesbehandlung.

(Aus dem Institut Pasteur in Bandoeng, Java).

Von **Jeanne van den Hoven van Genderen** und **J. H. Dik**.

Die immer mehr zunehmende Anzahl von Fällen sogenannter Paralyse im Verlaufe einer Antirabiesbehandlung, wobei in dem Gehirn der Patienten *Virus fixe* (V. f.) nachgewiesen werden konnte, war Veranlassung zu verschiedenen neueren Publikationen, in denen u. a. darauf hingewiesen wurde, daß die Anwesenheit von V. f. im Gehirn während und kurz nach einer Antirabiesbehandlung in keinem ursächlichen Zusammenhange mit den Paralysen stehen muß. Dies kann vielmehr eine Folge des Umstandes sein, daß das subkutan injizierte *Virus* im Zentralnervensystem zirkuliert oder daselbst deponiert wird und im latenten Zustand verbleibt, bis es schließlich vernichtet wird. Rein theoretische Schlußfolgerungen aus den Befunden von Paltauf¹⁾, der bei 4 mit

1) Wien. klin. Wochenschr. 1909.

Straßenvirus infizierten und interkurrent gestorbenen Personen dieses im latenten Zustände im Gehirn nachweisen konnte, ließen an diese Möglichkeit denken, doch soll dasselbe auch experimentell vor kurzem durch Quast¹⁾ in Breslau bei einigen mit V. f. behandelten Hunden festgestellt worden sein.

Liest man aber die viel zitierte Arbeit von Paltauf genauer, so findet man, daß die aus derselben gezogenen weitgehenden Schlüsse viel zu wenig gestützt sind. Der Beweis, daß in den Gehirnen der 4 genannten Patienten latentes Straßenvirus vorhanden war, wird nämlich in gar keiner Hinsicht erbracht.

Im Jahre 1899 impfte Paltauf intrazerebral einige Kaninchen mit der Medulla oblongata einer Person, 7 Jahre später (1906) von 2 und 1908 von 1 Person, die 22—27 Tage nach dem Bisse eines Hundes während der antirabischen Behandlung an interkurrenten Erkrankungen gestorben waren (Lungenembolie, Encephalomalacie, Delirium tremens). Nach einem Verlauf von resp. 3 Monaten, 47 und 40 Tagen starben alle diese Tiere unter folgenden Symptomen: Aufhören des Fressens, Abmagerung, wenig ausgesprochene Ataxien, paralytisches Endstadium. Genauere Angaben über die Zahl der gebrauchten Kaninchen, die Krankheitsdauer dieser Tiere sowie der Sektionsbefunde finden sich nicht in der erwähnten Arbeit.

Mit dem Gehirn dieser Kaninchen wird weiter geimpft, was nur in 1 Falle ein positives Resultat ergab; also auch in der 2. (und 3. Passage?) starben die Tiere unter demselben unbestimmten Krankheitsbilde. Die übrigen Tiere blieben gesund.

Trotzdem bei keinem der gestorbenen Tiere Negrische Körperchen gefunden werden konnten, waren die erwähnten Impfresultate für Paltauf genügend, um daraus zu schließen, daß die Tiere an Lyssa gestorben waren und daß also im Gehirn des Patienten Straßenvirus vorhanden war. („Da ergab sich nun bei den Tieren tatsächlich Lyssa“). Das Krankheitsbild war zwar nicht typisch, doch stimmte es überein mit der sogenannten „konsumptiven Wut“ und seine Schlußfolgerungen lassen sich auf folgende Weise zusammenfassen:

1) Straßenvirus, das beim Biß eingebracht wird, hatte sich, im Gehirne angekommen, daselbst wohl vermehrt (sonst wäre es nicht überimpfbar), doch mußte es zweifellos in ein stark abgeschwächtes Lyssavirus verwandelt sein, denn es hatte seine Virulenz für Kaninchen verloren, und zwar derart, daß es in aufeinanderfolgenden Passagen diese nicht wieder erlangen konnte. — 2) Das Krankheitsbild (lange Inkubationsdauer) der Kaninchen kann nicht durch eine kleine Menge vollvirulenten Straßenvirus, auch nicht durch abgeschwächtes V. f. verursacht sein, da in diesen Fällen in der 2. Passage das kürzere Inkubationsstadium wieder zurückkehrt.

Nach Paltauf muß man wohl annehmen, daß es häufig vorkommt, daß das Wutvirus nach der Verletzung ins Gehirn gelangt, dort langsam abgeschwächt wird, bis es vernichtet wird, analog der Veränderung des Lyssavirus, wenn dieses wenig empfindlichen Tieren (Affe, Huhn) intrazerebral eingeimpft wird. Der Mensch sollte also gewöhnlich eine latente Lyssainfektion durchmachen.

Bei objektiver Prüfung folgt aus Paltaufs Resultaten nur das eine, daß eine Anzahl Kaninchen einige Wochen oder Monate nach einer (intrazerebralen) Infektion kachektisch gestorben ist, was aber auch bei anderen Kaninchenversuchen vorkommt. (Kaninchenencephalitis?). Wenn bei Experimenten mit Straßenvirus einige Tiere unter typischen akuten Lyssasymptomen sterben und neben diesen auch einzelne unter weniger deutlichem, länger dauerndem

1) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 97.

Krankheitsbilde zugrunde gehen, so kann man vermuten (immer nur vermuten), daß man es bei den letzteren mit einer atypischen Form von Lyssa, sogenannter konsumptiver Wut, zu tun hatte. Wenn man aber nur auf Grund dieses unbestimmten Krankheitsbildes den umgekehrten Schluß zieht, daß das Ausgangsmaterial Straßenvirus enthielt, so ist dies wissenschaftlich nicht zu verteidigen.

Gegenüber der positiven Tatsache, daß die geimpften Tiere gestorben sind, findet sich in den genannten Fällen von Paltauf soviel Negatives (kein typisches Krankheitsbild, keine Negris, keine Ueberimpfbarkeit), ja es ist selbst nicht sicher, daß die gebissenen Personen bei der Verletzung auch wirklich mit Straßenvirus infiziert worden sind, denn der Biß eines toten Hundes bedeutet doch nicht immer eine stattgehabte Infektion. Man kann also aus diesen Versuchen wohl keinen einzigen ersten Schluß ziehen, viel weniger noch eine Theorie, wie die oben genannte aufstellen.

Unserer Ansicht nach bilden Paltaufs Fälle darum auch keineswegs eine Basis, die zur Klärung des Vorkommens von Virus fixe in dem Gehirn der an Paralyse gestorbenen Patienten beiträgt.

Indessen soll Paltaufs Theorie durch Versuche von Quast mit Hunden neuerdings eine große Stütze erfahren haben. Quast behandelte 3 gesunde Hunde mit V. f. auf dieselbe Weise, wie Gebissene, nämlich mit 20 subkutanen Injektionen (wobei wahrscheinlich nach der Breslauer Methode im ganzen 135 mg V. f. gegeben wurde). Von diesen Hunden wurden 2 am Tage der letzten Injektion, der 3. um 2 Tage später getötet und von jedem dieser Tiere wurden mit einer dicken Emulsion des Ammonshorns je 2 Kaninchen subdural geimpft.

Hierbei wurde folgendes Resultat erzielt: Von jedem Hunde blieb ein Kaninchen gesund, während das andere nach einigen Tagen krank wurde, und zwar nach Quast unter dem Bilde einer Virus fixe-Infektion (Nahrungsverweigerung, Zähneknirschen, Lähmung der Hinterhand). Dies erfolgte allerdings nur bei den Kaninchen von den die Hunde 1 und 2; beim Kaninchen von Hund 3 jedoch beschränkten sich die Symptome auf eine Schwäche der Hinterhand und schwankende Bewegungen des Kopfes, die 3 Tage anhielten, worauf das Tier getötet wurde. Die durch die Hunde 1 und 2 kranken Kaninchen wurden am Tage nach dem Auftreten der Krankheitserscheinungen getötet (Negris negativ) und mit den Gehirnen aller 3 Tiere hierauf weitere Passagen gemacht.

Von dem Kaninchen vom Hund 3 glückten diese weiteren Passagen nicht, wohl aber die mit dem Gehirn der Kaninchen von dem Hunde 1 und 2, und zwar mit der folgenden Inkubationsdauer:

	1. Passage	2. Passage	3. Passage	4. Passage
Hund 1:	6 Tage	4 Tage	2 Tage	8 Tage
	(1 von 2 Kaninchen)	(2 Kaninchen)	(2 Kaninchen)	(1 Kaninchen)
Hund 2:	14 Tage	6 Tage	5 Tage	
	(1 von 2 Kaninchen)	(2 Kaninchen)	(1 Kaninchen)	
Hund 3:	19 Tage	weiter negativ.		
	(1 von 2 Kaninchen)			

Quast schließt aus diesen Versuchen: 1) daß Virus fixe im Gehirn von 2 der 3 Hunde nachweisbar war. — 2) daß die Menge des bis ins Gehirn gedrun- genen Virus fixe nicht ausreicht, um in jedem Falle eine Infektion bei Kaninchen hervorzurufen. Er betrachtet es als in hohem Maße wahrscheinlich, daß das V. f. bei der Behandlung in das Zentralnervensystem gelangt, sich dort eine Zeitlang latent hält und allmählich abgebaut wird, vielleicht auch die Bildung von Antikörpern in diesem Organ anregt.

Unserer Ansicht nach lassen die erzielten Impffresultate auch hier daran zweifeln, ob es sich bei den Versuchstieren um eine V. f.-Infektion gehandelt

hatte. Daß eine V. f.-Infektion sich schon 2 Tage nach der Impfung manifestiert (siehe Hund 1 der 3. Passage), ist ja nicht anzunehmen.

Doch wenn auch zweifellos bewiesen sein sollte, daß die Kaninchen von Quast an einer V. f.-Infektion gestorben sind und die Anwesenheit desselben in den Gehirnen der Hunde also festgestellt wäre, könnte dies doch immer noch die Folge einer sich entwickelnden Paralyse gewesen sein, die, hätte man die Tiere nicht getötet, nach kurzer Zeit deren Symptome gezeigt hätten.

Ueber ähnliche Experimente, jedoch auf viel breiterer Grundlage, wobei auch die Kontrollen nicht vergessen wurden, berichten Remlinger und Bailly¹⁾. Sie konnten dabei Quasts Resultate nicht bestätigen.

Von 25 verschiedenen Tieren, nämlich 5 Katzen, 5 Kaninchen, 5 Meer-schweinchen und 10 Hunden, die zum Teil nach der Methode von Pasteur, wie sie in Tanger gebräuchlich ist, zum Teil (5 Hunde) nach der Methode von Philips Boecker (90 mg V. f. in 20 Tagen) behandelt waren, wurden im ganzen 18 Tiere in verschiedenen Zeiträumen, variierend zwischen 1 und 18 Tagen nach der letzten Injektion, getötet und eine dicke Emulsion des Bulbus auf V. f. untersucht. Bei keinem der Tiere konnte aber V. f. im Gehirn nachgewiesen werden. Alle Kontrolltiere (5) blieben am Leben.

Von jeder Gruppe von 5 Hunden starb 1 während der Behandlung (13. Tag) an Paralyse, doch wurde auch bei diesen Tieren kein V. f. in den Gehirnen nachgewiesen. Aus diesen Versuchen schließen die beiden Autoren, daß bei behandelten Tieren weder während, noch nach der Behandlung V. f. im Gehirn anwesend ist.

Wegen der großen Bedeutung dieser Frage machten auch wir an unserem Institut Versuche in derselben Richtung, und zwar mit Affen (*Maccacus rhesus*). Einer von uns (J. D. Dik) behandelte zu diesem Zwecke 4 Gruppen von zusammen 18 Affen in 11—20 Tagen subkutan mit Emulsionen von V. f. in steigenden Dosen nach folgendem Schema (Verdünnungsmethode):

Tabelle I.

Behandlungstag	Gruppe I 3 Affen	Gruppe II 3 Affen	Gruppe III 4 Affen	Gruppe IV 8 Affen
1	0,3 mg Vf	0,6 mg V,	1,5 mg Vf	4 mg Vf
2	0,6 dgl.	1,5 dgl.	3 dgl.	10 dgl.
3	1,5 "	3 "	6 "	15 "
4	3 "	6 "	15 ,l	"
5	6 "	15 "	30 "	30 mg Vf
6	15 "	15 "	60 "	60 dgl.
7	"	"	"	100 "
8	3 mg Vf	6 mg Vf	15 mg Vf	"
9	6 dgl.	15 dgl.	30 dgl.	200 mg Vf
10	15 "	30 "	60 "	200 dgl.
11	15 "	"	"	400 "
12	"	"	15 mg Vf	"
13	6 mg Vf	15 mg Vf	30 dgl.	"
14	15 dgl.	30 dgl.	60 "	"
15	30 "	"	"	"
16	"	"	"	"
17	"	15 mg Vf	"	"
18	15 mg Vf	30 dgl.	"	"
19	30 dgl.	"	"	"
20	"	30 mg Vf	"	"
Gesamtdosis	161 mg	212 mg	325 mg	1019 mg

1) Remlinger et Bailly, Compt. rend. Soc. Biol. Paris. März 1927.

Die Emulsionen wurden von frischem 1. Passage-Affen-Virus fixe bereitet, mit dem an unserem Institut die Gebissenen behandelt werden und dessen m. l. d. = 0,0025 mg beträgt.

Die Behandlungsschemata der Gruppen I und II sind dieselben, nach denen die gebissenen Europäer mit mäßig ernsten (I) und mit gefährlichen Verletzungen (II) behandelt werden.

Um nun die Gehirne der Affen nach dem daselbst deponierten oder in den selben zirkulierenden V. f. zu untersuchen, wurde ein Teil der Tiere in verschiedenen Zeiträumen nach der Behandlung getötet:

Gruppe I.

Affe 1: getötet 1 Std. nach der letzten Injektion,
 „ 2: „ 3 Tage nach der letzten Injektion,
 „ 3: wurde am Leben gelassen.

Gruppe II.

Affe 1: getötet 1 Tag nach der letzten Injektion
 „ 2: „ 3 „ „ „ „ „ „
 „ 3: am Leben gelassen.

Gruppe III.

Affe 1: getötet 1 Std. nach der letzten Injektion
 „ 2: „ 1 Tag „ „ „ „
 „ 3: „ 2 Tage „ „ „ „
 „ 4: „ 3 „ „ „ „ „

Gruppe IV.

Affe 1: getötet 1 Std. nach der letzten Injektion
 „ 2: „ 2 Tage „ „ „ „
 „ 3: „ 5 „ „ „ „ „
 „ 4: „ 6 „ „ „ „ „
 die anderen 4 Affen wurden am Leben gelassen.

Das Töten der Tiere erfolgte durch eine Injektion einiger cem Chloroform in das Herz, wodurch der Tod sogleich oder nach einigen Augenblicken eintrat. Also nicht durch Verbluten, und zwar, um zu verhindern, daß V. f., das sich zufälligerweise in den Blutgefäßen der Gehirne befinden könnte, aus denselben entfernt werde. Sofort nach dem Tode wurde der Schädel geöffnet und das Gehirn steril auspräpariert. Wegen der Möglichkeit, daß das sich darin befindliche V. f. nicht in der ganzen Gehirnmasse verteilt wäre, sondern auf dem einen Platze in größerer Menge als auf dem anderen vorhanden sein könnte, wurde die Gehirnmasse in 3 möglichst gleiche Stücke (± 20 g) geteilt (Hauptanteil der linken Hälfte, idem der rechten, Rest vom Großhirn + Kleinhirn + Medulla). Diese wurden in eine Stopfflasche gebracht, jedes separat, nach der hier gebräuchlichen Methode mit Glasperlen und etwas physiolog. NaCl-Lösung sehr fein geschüttelt und zu einer gleichmäßigen Emulsion verarbeitet.

Von jedem der Gehirnteile wurden Emulsionen von 3 verschiedenen Konzentrationen gemacht, und zwar 1:10, 1:100, und 1:1000 und davon 1 Meerschweinchen mit 0,2 cem intrazerebral geimpft. Von jedem Affen wurden also 9 Meerschweinchen geimpft. Dies geschah mit 12 von den 18 mit V. f. subkutan behandelten Affen, während wir 6 als Kontrolltiere leben ließen.

Das Resultat war, daß bei keinem der 108 geimpften Meerschweinchen eine V. f.-Injektion erzielt werden konnte; alle Impfungen verliefen negativ. Wohl wurde 1 Tier am 6. Tage nach der Impfung tot gefunden, und zwar das Tier, das mit einer Emulsion 1:10 der rechten Hemisphäre des Affen 2 von der Gruppe III geimpft und 1 Tag nach Ablauf der Behandlung getötet worden war, doch enthielt das Gehirn dieses Meerschweinchens kein V. f. Weitere Impfungen auf 2 andere Meerschweinchen verliefen ohne Erfolg. Man kann also annehmen, daß das betreffende Meerschweinchen nicht an V. f. gestorben war.

Es ist also nicht gelungen, und zwar auch nicht bei den Affen der Gruppe IV, wobei in kurzer Zeit sehr große Mengen (mehr als 1000 mg) verhältnismäßig

kleinen Tieren (Gewicht durchschnittlich $3\frac{1}{2}$ kg) subkutan injiziert wurden, dieses Virus kurz nach der Behandlung im Gehirne wieder zu finden.

Die 6 Kontrollaffen, und zwar auch die der Gruppe IV, blieben alle gesund. Keiner von ihnen bekam Paralyse.

Wenn dies letztere wohl der Fall gewesen wäre mit positivem Gehirnbefund, so hätte eine eventuell positiv ausgefallene Impfung mit den Gehirnen der anderen, in scheinbar gesundem Zustand getöteten Affen ebenfalls einer sich entwickelnden Paralyse zugeschrieben werden können. Dann sollte man aber auch erwarten können, daß das V. f. schon in ziemlich großer Menge in den Gehirnen anwesend war, weshalb wir den Meerschweinchen eben Emulsionen in einer Verdünnung von 1:1000 injizierten.

Ausgehend von der Tatsache, daß die m. l. d. unseres V. f. 0,0025 mg beträgt, läßt sich leicht berechnen, daß bei den geimpften Affen wenigstens 2,5 mg V. f. in einem der Gehirnteile von + 20 g deponiert und in vollvirulenter Form bewahrt sein müßte, um zu ermöglichen, daß mit 0,2 ccm einer Emulsion von 1:10 ein positives Resultat erzielt werde.

Aus unseren Versuchen kann also nichts anderes geschlossen werden, als daß eine Menge von 2,5 mg virulentem Virus (= 1000 m. l. d.) oder eine diesem äquivalente Menge abgeschwächten Virus nicht in einem der Gehirnteile vorhanden war. Theoretisch schließt dies natürlich die Möglichkeit nicht aus, daß eine kleinere Menge vorhanden war, und wenn wir den Meerschweinchen eine stärker konzentrierte Emulsion als 1:10 injiziert hätten, diese wohl an einer Virus fixe-Infektion gestorben wären. Wäre z. B. 1 mg virulenten Virus in einem der Gehirnstücke vorhanden gewesen, dann hätten 0,2 ccm einer Emulsion 1:4 einen tödlichen Effekt zur Folge haben können.

Wir wissen nicht, ob 1 mg Virus als deponiertes Virus eine große Menge ausmacht. Es dürfte aber sehr unwahrscheinlich sein, daß eine solche Menge, die 400 m. l. d. entspricht, eine für Affen bei intrazerebraler Infektion mehr als tödliche Dosis, im Affengehirn verbleiben könnte ohne zur weiteren Entwicklung zu kommen.

Nimmt man an, daß das Gewicht des Ammonshornes 1 g war und die injizierte Menge 0,2 ccm einer Emulsion 1:3 betragen hat, so kann man auch berechnen, daß bei den Versuchen von Quast allein in den untersuchten Ammonshornen der Hunde schon eine Virusmenge gleich der von 15 m. l. d. vorhanden sein müßte, um bei den geimpften Kaninchen ein positives Resultat geben zu können. Wie groß in Übereinstimmung damit die Gesamtmenge des in dem Gehirn (60 g) deponierten Virus gewesen sein kann, ist schwer zu sagen (möglicherweise ungleichmäßige Verteilung), 400—500 m. l. d. ist jedoch wahrscheinlich nicht zu hoch geschätzt. Nehmen wir ferner an, daß die m. l. d. des Breslauer Virus ebenso klein ist als die unsere ($\frac{1}{400}$ mg), dann muß man zu dem Schlusse kommen, daß von dem subkutan injizierten Virus (135 mg) beinahe 1 Proz. in dem Gehirne deponiert wurde. Dies ist jedoch schwer anzunehmen.

Wenn auch unsere oben beschriebenen Versuche mit Affen für das zu lösende Problem weder im positiven noch im negativen Sinne einen absoluten Beweis erbracht haben, so zeigen sie doch, daß die Frage nicht so einfach ist, als man aus Quasts Versuchen annehmen könnte. Theoretisch ist es natürlich möglich, daß bei subkutanen Injektionen von V. f. sehr kleine Mengen Virus ins Gehirn gelangen. Wenn aber dieses Virus sich durch Impfversuche nachweisen läßt, so muß man annehmen, daß die deponierte Menge so groß ist, daß man nicht anders als von einem pathologischen Zustande des Gehirnes sprechen kann, der schwer mit einem gesunden Zustand des Individuums in Einklang zu bringen ist.

Nachdruck verboten.

Beitrag zur Kenntnis des Poliomyelitis-, Encephalitis- und Herpesvirus.

(Aus der Kgl. Universitätskinderklinik zu Palermo
(Direktor: Prof. G. Di Cristina).)

Von Dr. **M. Gerbasi** und Dr. **M. Giuffrè**, Assistenten.

Wenige Krankheiten sind in den letzten Jahren Gegenstand so zahlreicher Untersuchungen und so lebhafter Erörterungen gewesen, wie Poliomyelitis anterior acuta, Encephalitis epidemica und Herpes; und bei wenigen Argumenten gehen so wie hier die Meinungen der verschiedenen Untersucher auseinander.

Zur Vermeidung einer allzulangen und trockenen Darlegung wollen wir uns daher darauf beschränken, die grundlegenden Daten und die noch zur Diskussion stehenden Daten aufzuführen. Diese Darlegung soll in folgender Reihenfolge geschehen:

- 1) Poliomyelitis anterior acuta (Heine-Medinsche Krankheit).
- 2) Encephalitis epidemica.
- 3) Herpesvirus.
- 4) Aetiologische Beziehungen zwischen Encephalitis und Herpes (Levaditische Vorstellung).

1. Heine-Medinsche Krankheit.

Die ersten positiven Resultate der Uebertragung der Krankheit auf Tiere sind die von Landsteiner und Popper, die 1909 in Wien durch Inokulation von Nervensubstanz aus einem Fall von Kinderlähmung beim Affen typische Symptome und pathologisch-anatomischen Befund reproduzierten. Diese Resultate wurden in der Folge von Levaditi in Schweden, Flexner und Lewis in Amerika sowie von Knöpfelmacher, Strauß und Hounton, Leiner und Wiesner, Römer und Joseph bestätigt.

Bereits früher (1905) hatte Giersvold behauptet, er habe in der Zerebrospinalflüssigkeit von Individuen mit Heine-Medinscher Krankheit sehr häufig einen grampositiven Diplokokkus aufgefunden. Einen ähnlichen Mikroorganismus isolierten Fox und Rucher, diese Befunde fanden aber wegen des fehlenden Nachweises der Pathogenität des isolierten Keimes und der von zahlreichen Untersuchern (Wickmann, Landsteiner und Popper, Römer usw.) erhaltenen negativen Resultate, wie auch infolge des Nachweises der Filtrierbarkeit des Virus durch Chamberland-Kerzen V und N und Reichel-Kerzen, der 1909 fast gleichzeitig von Flexner und Lewis und von Landsteiner und Levaditi erbracht wurde, keinen Anklang. Die Versuche, den Erreger der Krankheit zu züchten, wurden 1913 mit Erfolg von Flexner und Noguchi wieder aufgenommen, die als Nährboden den von Noguchi für die Züchtung der Spirillen (Bouillon mit Aszitesflüssigkeit und frischem Tierorganstückchen, bedeckt von Vaselineöl) vorgeschlagenen benutzten und Kulturen erhielten, mit denen es auch bei sehr vorgerückten Generationen möglich war, bei Affen die charakteristische Symptomatologie der Infektion zu reproduzieren. Ungefähr 5—6 Tage nach der Einsaat, die mit Nervengewebe und mit filtriertem Virus geschah, bekommt man eine Trübung der Kulturflüssigkeit, die am Boden beginnt und sich weiterhin auf die oberen Schichten ausbreitet. Nach ungefähr 10—14 Tagen klärt sich die Flüssigkeit, während sich am Boden des Röhrchens ein feiner Staub ablagert. Bei der mikroskopischen Untersuchung der Präparate, in frischem Zustand oder nach Giemsa gefärbt, werden in diesen Kulturen äußerst winzige Kokken nachgewiesen.

Diese Untersuchungen wurden 1916 von Pröschner bestätigt, der einem *Macacus rhesus* intrakraniell eine Kultur 40. Generation eines seit 4 Monaten isolierten Stammes inokulierte und nach einer Inkubationszeit von 40 Tagen Parese der vorderen Extremitäten erhielt, die nach ca. 15 Tagen verschwand.

Weitere Untersuchungen bestätigen zwar die Züchtbarkeit des Virus, zielen aber darauf ab, dem Erreger einen besonderen Pleomorphismus beizumessen. Mathers behauptete 1917,

er habe aus dem Nervensystem von Poliomyelitikern einen Kokkus isoliert und durch Kulturen desselben die typische Symptomatologie bei Tieren reproduziert.

Rosenau, Town und Wheeler isolierten aus verschiedenem von einem Poliomyelitiskranken stammenden Material einen Streptokokkus, kleiner als der Diplokokkus. Dieser Mikroorganismus soll bei Tieren die Krankheit reproduzieren und soll in den Nährböden mit Zusatz von Aszitesflüssigkeit leicht züchtbar sein. In Anaërobie soll er dann das von Flexner und Noguchi beobachtete Aussehen annehmen und fähig werden, durch Bakterienfilter hindurchzugehen.

Zu ähnlichen Schlüssen kamen bei ihren Untersuchungen Nuzum und Herzog. Diese behaupteten, einen Mikrokokus isoliert zu haben, der fähig sei, bei Affen ein der menschlichen Krankheit ähnliches Bild hervorzurufen. Dieser grambeständige Mikroorganismus wäre in Aszitesbouillon mit Zusatz von Dextrose und frischer Kaninchenniere aerob züchtbar. Anaërob soll er sehr kleine Dimensionen annehmen und fähig werden, Filter N zu passieren.

Gleichlautende Resultate mit denjenigen Flexners und Noguchis erzielte 1918 Amoss. Im Widerspruch zu diesen Ergebnissen stehen die Untersuchungen Bulls (1918), der aus 32 Poliomyelitiställen Streptokokkustämme isolierte, die, den gewöhnlichen Laboratoriumstieren injiziert, nicht imstand waren, der menschlichen Krankheit ähnliche Symptome auszulösen, sondern nur banale Läsionen (Meningitis, Arthritis, Abszesse usw.). Ganz analog zeigten sich Stämme, die aus mit Poliomyelitisvirus infizierten Affen isoliert wurden.

Auch Kolmer, Brown und Freese isolierten Mikrokokken aus dem Nervensystem, der Milz, Leber und anderen Organen von Individuen mit Poliomyelitis, es gelang ihnen aber nicht, mittels Kulturen dieser Mikroorganismen charakteristische Läsionen bei Tieren zu reproduzieren.

Rosenow (1925) findet eine Präzipitationsreaktion mit Poliomyelitikerserum und Antigen aus Kulturen eines Streptokokkus, der aus dem Rachen von Poliomyelitiskranken isoliert worden war, spezifisch und führt die Aetiologie der Heine-Medinschen Krankheit auf den Streptokokkus zurück.

Aus vorstehender Darlegung ergibt sich, daß, während die Pathogenität des Poliomyelitisvirus für Laboratoriumstiere und die Filtrierbarkeit desselben sicher nachgewiesen ist, die Flexner und Noguchischen Untersuchungen diejenigen sind, die die meisten Bestätigungen, namentlich in Amerika, erhalten haben.

In Italien sind sie von Maggiore und Sindoni, Sindoni und Misasi, Leone und Gerbasi bestätigt worden.

Pagani Cesa teilte neuerdings mit, er habe bei Poliomyelitis acuta einen filtrierbaren Keim beobachtet, der sich im Di Cristinaschen Nährboden gut züchten lasse.

2. Encephalitis epidemica.

Während hauptsächlich durch das Verdienst v. Economos die Bedeutung dieser neuen Krankheit sich immer mehr durchsetzte, vervielfältigten sich die Untersuchungen über die Aetiopathogenese derselben. Die Resultate, zu denen die verschiedenen Autoren gelangten, lassen sich wie folgt zusammenfassen:

a) Die Encephalitis epidemica wäre eine Krankheitsform mit eigener Aetiologie.

b) Sie bildete eine klinische Kundgebung in Zusammenhang mit verschiedenen krankhaften Zuständen: vor allem Grippe und Influenza; oder mit Intoxikation durch *Bacillus botulinus*.

c) Das Krankheitsbild der Encephalitis epidemica soll auf Lokalisierung desselben Erregers der Heine-Medinschen Krankheit in den Nervenzentren beruhen.

d) Das Encephalitisvirus soll eine Variante des Herpesvirus darstellen: Beide sollen einer großen Viruskategorie mit elektiver Affinität für die vom Ektoderm sich ableitenden Gewebe angehören: das erste mit ausgeprägterer neurotropher Affinität, das zweite mit stärkerer epitheliotropher Affinität.

a) Verfechter der 1. Hypothese war v. Economo selbst und in Frankreich Netter. Unter den verschiedenen Befunden von bekanntgegebenen Keimen ist als erster der von Wiesner (1917) zu erwähnen, der aus dem Nervensystem eines mit Hirnsubstanz von einem

Encephalitiker geimpften Affen einen anaëroben, hämolytischen, gramnegativen Diplo-Streptokokkus isolierte. In der Folge bekam in Italien Monti zwar ein negatives Resultat bei der bakterioskopischen Untersuchung von Hirnsubstanz eines Encephalitikers, Ottolenghi, D'Antona und Tonietti erzielten aber 1920 durch Inokulation von Zerebrospinalflüssigkeit beim Meerschweinchen die Uebertragung der Krankheit, negatives Resultat dagegen ergaben Züchtungsversuche. Sie wiesen die Filtrierbarkeit des Virus nach. Einige Zeit darauf erzielte Bastai durch Inokulation von Nervensubstanzfiltrat eines Encephalitikers bei der Katze charakteristische nervöse Symptome. Maggiore, Tombolato und Mentovani injizierten Meerschweinchen Blut und Zerebrospinalflüssigkeit von Encephalitiskranken und erzielten den Exitus mit vorausgehenden nervösen Erscheinungen. Aus dem Blute züchteten sie in Aszites-agar einen fakultativ anaëroben, grampositiven Diplokokkus. Santangelo und Zanelli bestätigten die Filtrierbarkeit des Virus der Encephalitis epidemica und erhielten die Uebertragung der Krankheit auf Kaninchen und Meerschweinchen mittels Inokulation von Liquor cerebrospinalis und Blut. Bastai teilte 1921 mit, es sei ihm gelungen, in 3 Fällen von Encephalitis epidemica aus dem Nervensystem im Noguchischen Nährboden einen äußerst kleinen, gramnegativen, nicht hämolytischen, filtrierbaren, für die gewöhnlichen Laboratoriumstiere pathogenen Mikroorganismus zu isolieren. In bezug auf die Bedeutung desselben aber, ob er nämlich als Erreger der Krankheit oder als Assoziationskeim zu betrachten sei, drückt sich Verfasser zurückhaltend aus.

Piazza führte bei 36 Fällen von Encephalitis kulturelle Untersuchungen aus; nur in einem Fall erzielte er aus dem Blut die Isolierung eines kleinen, äußerst beweglichen, in jungen Kulturen gramnegativen und in den älteren grampositiven, obligatorisch aëroben Bazillus, der sich in Nährböden mit Glycerinzusatz gut entwickelt. Die Inokulation dieser Kulturen war imstande, bei Meerschweinchen und Kaninchen den Tod nach 15 oder 20 Tagen hervorzurufen: bei der pathologisch-anatomischen Untersuchung wurde im Hirn Hyperämie, kleine Blutungen und perivasale kleinzellige Infiltration gefunden.

Rosenow (1922) fand bei 21 tödlich verlaufenen menschlichen Encephalitisfällen konstant Anwesenheit von grampositiven Diplokokken in den perivasalen Infiltrationsherden oder isoliert im Hirn.

Kokken, verschieden nach Größe, Gruppierung und biologischen Eigenschaften, wurden aus dem Blut, der Zerebrospinalflüssigkeit und den Nervenzentren isoliert von Stafford, Sternberg, Siegmund, Deutsch, Oberndorfer, Cohn und Lauber, Boccolari, Gabbi, Colombo, Orlando, Cantieri e Vegni, Zuccola, Boccolari und Panini, Nigrobello, Sampietro, Pisani und Varisco.

Konstant negatives Resultat erhielten Flexner und Amoss, Ford und Amoss bei intrakranieller Inokulation von Zerebrospinalflüssigkeit und Gehirn von Encephalitikern in Kaninchen.

b) Unter den Hypothesen, die das Krankheitsbild der Encephalitis epidemica als von einer auf verschiedenen Ursachen beruhenden Intoxikation abhängig angesehen wissen möchten, ist eine der ersten die von Harris, nach der die Encephalitis epidemica auf Intoxikation durch *Bacillus botulinus* beruhen würde.

Wir wollen bei dieser nicht auf tatsächliche Elemente gestützten Hypothese nicht weiter verweilen, sondern ohne weiteres zur Prüfung der behaupteten ätiologischen Beziehungen zwischen Encephalitis epidemica und Influenza übergehen.

Schon vor der letzten Influenzapandemie und vor allem gelegentlich der Nona, die gegen Ende der Pandemie von 1889—1890 beobachtet wurde, wurde von Mauthner die Hypothese ausgesprochen, daß das Influenzavirus sich im Gehirn lokalisieren könne.

Im Jahre 1892 teilte Leichtenstern mit, er habe im Verlauf einer Influenzaepidemie Fälle von hämorrhagischer Encephalitis beobachtet. Das bereits ein Jahr vorher von Strümpell skizzierte anatomische Bild bestand in punktförmigen hämorrhagischen Herden, die sowohl in der Rinde wie entsprechend den Kernen der Basis disseminiert waren, und in Erscheinung kleinzelliger Infiltration.

Späterhin wurden Fälle von Encephalitis mit Mittelhirnlokalisation (Encephalitis vom Typus Wernicke), sekundär zu Influenza, von Uthoff, Oppenheim, Morawieff u. a. beschrieben. Bozollo (1900) und Chartier (1908) beschrieben Krankheitsbilder von Encephalitis acuta, die während Influenzaepidemien unter derartigen Umständen beobachtet wurden, daß sie die Autoren zur Ansicht führten, daß die zwei Krankheiten von demselben Erreger abhingen.

Das Auftreten von Encephalitisfällen gegen das Ende der Influenzapandemie von 1917/18 ließ sofort das Vorhandensein eines ätiologischen Zusammenhanges zwischen den beiden Krankheiten argwöhnen.

Vor allem in Italien sprachen einige Beobachter (Francioni, Prezzolini, Albertoni, Queirolo, Soffrè und Mingazzini) auf Grund epidemiologischer und klinischer Betrachtun-

gen und des pathologisch-anatomischen Befundes die Meinung aus, daß der encephalitische Symptomenkomplex eher auf Toxinschädigungen der Nervenzentren als auf einer Lokalisierung des Keimes der Influenza beruhe.

In England suchte Krockshank die ätiologische Einheit der beiden Krankheiten nachzuweisen, indem er das epidemiologische Wiederkehren derselben studierte.

Tarozzi beobachtete, daß bei an Encephalitis epidemica Verstorbenen häufig Influenza-Bronchopneumonieherde angetroffen werden, und daß die histologischen Läsionen der Encephalitis epidemica nicht von denjenigen der Influenza-Encephalitis verschieden sind, und fand andererseits bei an Influenza verstorbenen Individuen encephalitische Reaktionserscheinungen. Durch intrakranielle Inokulation des Filtrates von aus Influenza-Bronchopneumonieherden isolierten Diplokokken in Kaninchen reproduzierte er das histologische Bild der Encephalitis epidemica. Er schloß daraus auf die Einheit der zwei Krankheiten.

Piazza inokulierte Kaninchen und Meerschweinchen das Gehirn von an experimenteller Diplokokkusseptikämie verendeten Tieren und beobachtete, daß bei sukzessiven Passagen „der mittels des Gehirnes transplantierte Originalstamm die Eigenschaft erwirbt, sich elektiv in der Zerebrospinalachse zu lokalisieren“.

Bei der histologischen Untersuchung des Hirnes werden encephalitische Erscheinungen angetroffen.

Volpino und Racchiusa (1922) erzielten mit Sputis von Grippekranken, die lange gewaschen, 5—15 Tage in Glycerin gehalten worden waren und keine Keratitis gaben, bei Kaninchen mittels der intrakraniellen Inokulation den Tod der Tiere nach ca. 15 Tagen mit einem der menschlichen Encephalitis ähnlichen Bild. Dieses unsichtbare, aber nicht filtrierbare Virus soll nach den Verfassern das Influenzavirus sein.

Auch neuerdings wird die Frage nach den ätiologischen Beziehungen zwischen Influenza und Encephalitis epidemica von Hagelstam wieder aufgeworfen.

c) Während man namentlich in Europa darüber diskutierte, ob die Encephalitis epidemica eine nosologische Wesenheit bildete oder eine auf dem Influenzavirus beruhende Krankheitsform darstellte, erzielten Strauß, Hirschfeld und Löwe 1919 in Amerika, indem sie Affen und Kaninchen Material von Encephalitiskranken (Filtrat des Spülwassers der Nasen-Rachenhöhle, Zerebrospinalflüssigkeit, Nervensubstanz) inokulierten, die Reproduktion eines Krankheitsbildes, das viel Analogie mit dem auf dem Virus der Heine-Medinschen Krankheit beruhenden aufwies.

Ein Jahr darauf erhielten dieselben Autoren durch Inokulation von Encephalitis material in Noguchischen Nährboden die Entwicklung von kleinen, unbeweglichen, isolierten oder verschieden gruppierten Kokken, die, nach den morphologischen, biologischen und kulturellen Eigenschaften, den bereits von Flexner und Noguchi bei der Heine-Medinschen Krankheit nachgewiesenen ähnlich waren. Mit Kulturen vorgerückter Generation und mittels intrakranieller Inokulation erhielten sie bei Tieren die Reproduktion eines Krankheitsbildes, ähnlich dem durch das Virus hervorgerufenen.

Fast gleichzeitig (1920) erzielten in Italien Maggiore und Sindoni durch Verimpfung von Zerebrospinalflüssigkeit und Blut encephalitiskranker Kinder in Tarozzi-Noguchischen Nährboden, der in Anaerobiose bei 37° gehalten wurde, die Entwicklung eines Keimes, der sich in mit den gewöhnlichen Anilinfarben und nach Leishman gefärbten Präparaten in Gestalt eines kleinen isolierten oder in kurzen Ketten angeordneten Kokkus zeigte. Die intravenöse oder intrakranielle Inokulation von Passagekultur rief bei Kaninchen fortschreitende Abmagerung, Exophthalmus, Mydriasis, Tremor, Parese oder Paralyse und häufig den Tod hervor; die serienweise Uebertragung war möglich.

Die morphologischen, biologischen und kulturellen Eigenschaften dieses Keimes, verglichen mit denen des Noguchischen Keimes, veranlaßte diese Autoren, die Identität der beiden Stämme anzunehmen. Weitere vergleichende Untersuchungen zwischen dem aus den Encephalitisfällen und dem aus Patienten mit Poliomyelitis anterior acuta isolierten Virus führten Sindoni und Misasi, Leone und Gerbasì zu demselben Schluß.

Aus vorstehender Darlegung ist vor allem zu ersehen, daß, obwohl die Autoren zahlreich sind, die dahin neigen, die Encephalitis epidemica als eine nosologische Wesenheit für sich zu betrachten, die bakteriologischen Befunde nicht untereinander in Einklang stehen. Diese Befunde müssen sicher als zufällige betrachtet werden; übrigens läßt es die Mehrheit der Autoren bei Bekanntgabe der Resultate ihrer Untersuchungen nicht an Zurückhaltung bei der Bewertung fehlen.

Keine größere Beachtung verdient die Meinung, nach der die Encephalitis epidemica in Zusammenhang mit der Influenza stünde. Das epidemiologische Kriterium vor allem kann nicht, wie einige meinen, einen absoluten Beweis bilden: Das Zusammenfallen von Fällen von Encephalitis epidemica mit Influenzafällen bestätigt sich nicht immer, ebensowenig wie die Anwesenheit von Influenza-Symptomen oder -Lokalisationen bei Individuen mit Encephalitis epidemica konstant ist.

Kein besseres Kriterium kann die Ähnlichkeit oder Identität zwischen dem pathologisch-anatomischen Befund der Influenza-Encephalitis und dem der Encephalitis epidemica bilden. Beide unterscheiden sich nicht — wie Tarozzi bemerkt — von dem der nichteitrigen Encephalitis, wie er vor allem von Chartier gut beschrieben worden ist und dem die verschiedenartigste Aetiologie zukommt. Nimmt die Influenza den ersten Platz ein, so muß doch auch an Typhus, Milzbrand, Rotlauf, akuten Rheumatismus, Pneumonie, Syphilis, einige Septikämien und viele andere akute und chronische Infektionen, wie auch an einige Intoxikationen (Alkoholvergiftung intestinalen Ursprungs, Arsenikvergiftung usw.) erinnert werden. Anatomische Merkmale derselben sind das Fehlen eines serösen oder eitrigen Exsudates, die Anwesenheit von kleinen Blutungen und Zellinfiltraten in Form von isolierten Herden und perivaskulären Muffen. Die Infiltrationselemente bestehen in der Mehrheit aus Lymphozyten, während neutrophile polynukleäre Zellen fehlen oder sehr spärlich sind.

Auch die Ähnlichkeit des histologischen Befundes der bei Tieren reproduzierten Encephalitis mit dem bei der Krankheit des Menschen beobachteten kann nicht nützen. A priori muß gesagt werden, daß es nicht möglich ist, die experimentell erzielten Resultate auf die spontane Krankheit zu übertragen. Und dann ist auch bei den Tieren das Vorhandensein einer experimentellen, nichteitrigen Encephalitis zu beachten, die nicht nur ein gleichförmiges pathologisch-anatomisches Bild hat, sondern auch in den allgemeinen Linien nicht von der nichteitrigen Encephalitis des Menschen abweicht. Verschiedene Toxine wie die des Influenzabazillus (Cantani), des Staphylokokkus (Cesaris-Demel), des Influenza-Diplostreptokokkus (Tarozzi), der Diphtherie und des Tetanus (Piazza) und Hyphomyzeten reproduzieren die gewohnten Gehirnveränderungen.

Auf sichere Tatsachen, wie die bakteriologische Untersuchung und die Möglichkeit, die experimentelle Krankheit mittels Kultur hervorzurufen, gegründet erscheinen die Untersuchungen von Strauß, Hirschfeld und Löwe und die Meinung von Maggiore und Sindori, nach der die Heine-Medinsche Krankheit und die Encephalitis auf verschiedener Lokalisation desselben Keimes beruhen.

d) Auf die Beziehungen zwischen Encephalitis epidemica und Herpes werden wir nach Besprechung der Untersuchungen über Herpesviren eingehen.

3. Herpesvirus¹⁾.

Keinerlei Bedeutung kann den von Koritschoener, Hoff und Silberstein, Orel und Silberstein isolierten Viren beigemessen werden, da die

1) Wir wollen hier nur von den Viren des Herpes simplex sprechen, indem wir die Frage des Herpes zoster unberührt lassen.

Untersuchungen Nicolaus' nachgewiesen haben, daß dieselben als Tollwutvirus betrachtet werden müssen; ebenso wenig den von Kling, David und Lilienquist und von Thalimber isolierten, nachdem Levaditi und Mitarbeiter dargetan haben, daß dieselben nichts anderes sind, als das Virus der spontanen Encephalomyelitis des Kaninchens, auf die wir später zurückkommen werden.

Im Jahre 1913 erhielt Gruter durch Inokulation des Inhaltes der Bläschen von Herpes corneae auf die vorher scarifizierte Hornhaut von Kaninchen die Reproduktion einer Keratokonjunktivitis, die serienweise übertragbar und vor allem durch das Fehlen banaler Keime charakteristisch war.

In den Jahren 1819—20 teilten Kraupa und Löwenstein mit, beim Kaninchen eine charakteristische Keratokonjunktivitis auch durch Inokulation des Inhaltes von Bläschen von Herpes febrilis reproduziert zu haben. Fast gleichzeitig erhielt Baum dasselbe Resultat mit dem Inhalt von Bläschen von Herpes genitalis. Diese Untersuchungen wiesen die infektiöse Natur der Herpes nach, während die späteren von Löwenstein die Filtrierbarkeit des Herpesvirus dartaten. Es kam dann weiterhin die Beobachtung von Doerr und Vöchting, daß auf die Keratitis beim Kaninchen allgemeine Symptome (Fieber, Abmagerung) und charakteristische Encephalitis-symptome folgen können, denen ein konstanter pathologisch-anatomischer Befund entspricht. Seitdem sind zahlreiche Untersuchungen einander gefolgt, wodurch ein erheblicher Beitrag zur Kenntnis des Argumentes erbracht wurde. Da uns eine ausführliche Darlegung derselben zu weit führen würde, beschränken wir uns darauf, die grundlegenden Daten der Frage darzulegen und erwähnen nur die Namen einiger Autoren (Doerr, Schnabel, Vöchting, Berger, Luger, Lauda, Marinesco und Draganesco, Levaditi und Mitarbeiter, Kling und Mitarbeiter, Danila, und Stroe, Netter, Isaicu und Telia und unter den Italienern Fontana, Gaviati, Veratti und Sala, Mariani, Morelli, Golgi, Da Fano, Giuffrè usw.). Wegen größerer Einzelheiten verweisen wir auf die synthetischen Arbeiten von Fontana, Mariani und Doerr.

Auf die Hornhaut-Inokulation folgt beim Kaninchen nach einem Zeitraum von 20—40 Std. eine durch Infiltration und Bildung von kleinen Bläschen längs der Ränder der Skarifikationen sowie durch charakteristisches chleimig-eitrige Absonderung gekennzeichnete Kerato-Konjunktivitis. Während diese lokalen Symptome sich soweit zurückbilden, daß sie innerhalb 5—8 Tagen ganz verschwinden, tritt häufig nach wechselnder Zeit eine durch tonisch-klonische Kontraktionen verschiedener Muskelgruppen, Manegebewegungen, Trismus, Speichelfluß, Parese und Paralyse der Extremitäten gekennzeichnete nervöse Symptomatologie auf.

Häufig tritt der Tod ein. Bei der pathologisch-anatomischen Untersuchung werden vorwiegend Läsionen zu Lasten des Gehirns angetroffen: Hyperämie der Meningen und der grauen Substanz, punktförmige Blutungen, Verdickung der Pia mater, isolierte Infiltrationsherde oder in perivaskulären Anhäufungen, gewöhnlich aus lymphozytoiden Elementen bestehend.

Sowohl die Keratitis wie die Encephalitis sind serienweise reproduzierbar: die Encephalitis wird sowohl durch intrakranielle Inokulation wie durch Inokulation in den Kreislauf, auf die Schleimhäute, in die Dicke der Nervenstämme, in Lunge und Hoden erhalten. Als das empfänglichste Tier erweist sich das Kaninchen, die Krankheit kann aber auch bei Meerschweinchen und weißen Mäusen reproduziert werden.

Was die Eigenschaften des Virus anbelangt, so sind sich fast sämtliche Autoren (Luger, Blanc und Mitarbeiter, Mariani, Vegni, Bastai, Morelli, Veratti und Sala) in der Annahme der Filtrierbarkeit derselben durch die gewöhnlichen Filter und die Ultrafilter aus Kollodium (Levaditi und Nicolai) einig. Es verliert seine Virulenz nach 24 Std. bei Zimmertemperatur und nach $\frac{1}{2}$ Std. der Erhitzung auf 55°. Im Eisschrank und in Glycerin läßt es sich lange halten.

Was die Pathogenese der Herpesinfektion beim Menschen angeht, so haben die interessanten Untersuchungen von Bastai und Busacca, die von Veratti und Sala durch den Nachweis des Herpesvirus in der Zerebrospinalflüssigkeit und im Blut von herpeskranken oder anscheinend gesunden Individuen bestätigt wurden, dargetan, daß der Herpes simplex als eine allgemeine Krankheit betrachtet werden muß. Das Herpesvirus verbleibe nach einer ersten Infektion eine unbestimmte Zeit lang im Organismus im latenten Zustand und gäbe zu Hautkundgebungen Anlaß, wenn irgendein aspezifischer Reiz dazwischen kommt.

4. Aetiologische Beziehungen zwischen Encephalitis und Herpes. (Levaditische Auffassung).

Im Jahre 1920 kündigten Levaditi, Harvier und Nicolau an, daß es ihnen nach vielen vergeblichen Versuchen gelungen sei, beim Affen und Kaninchen mittels intrazerebraler Inokulation von Nervensubstanz von Encephalitikern ein durch nervöse Erscheinungen und anatomische Läsionen gleich den beim Menschen angetroffenen gekennzeichnetes Krankheitsbild zu

reproduzieren. Da Dörr, Vöchting und Schnabel auf die Ähnlichkeit zwischen dem Bild der durch dieses Encephalitisvirus hervorgerufenen experimentellen Krankheit und demjenigen der durch das von Blanc isolierte Herpesvirus hervorgerufenen Krankheit aufmerksam gemacht hatten, kamen später die ersterwähnten Autoren nach einer Reihe experimenteller Untersuchungen zu der Ueberzeugung, daß die beiden Viren wesentlich gleich seien. Beide wären filtrierbar, hätten keratitogenes und encephalitogenes Vermögen für das Kaninchen, das klinische und pathologisch-anatomische Bild der experimentellen Krankheit wäre identisch; und schließlich erzeugte die Inokulation des einen beim Kaninchen einen Immunitätszustand gegen die Inokulation des anderen.

Späterhin fanden Levaditi und Mitarbeiter bei Untersuchung des Speichels gesunder Individuen auf das Encephalitisvirus bei 80 Proz. der Fälle Anwesenheit eines keratitogenen Virus und bei 15 Proz. Anwesenheit eines keratito-encephalitogenen Virus, das sie für sehr ähnlich mit dem von ihnen isolierten Encephalitisvirus hielten. Sie gaben nun der Hypothese Ausdruck, daß die drei Viren (Speichel-, Herpes- und Encephalitisvirus) Formen desselben Virus (des encephalitogenen Ultravirus) mit verschiedener neuro- oder epitheliotroper Affinität darstellten. Dieses Kriterium erweiternd, versuchte Levaditi, einen ätiologischen Nexus zwischen einigen Krankheiten (Encephalitis, Poliomyelitis, Rabies) festzustellen, deren Viren elektive Affinität für die vom Ektoderm sich herleitenden Gewebe besitzen sollen, und schlug für dieselben die Bezeichnung „neurotrophe Ektodermosen“ vor.

Abgesehen von den verschiedenen Betrachtungen klinischer und epidemiologischer Art, die von Netter, Tessier, Gustinel und Reilly, Micheli usw. dieser Lehre entgegengehalten wurden, geben die experimentellen Untersuchungen, auf die sich dieselbe gründet, nach Kling, David und Liljenquist, vor allem aber nach Bastai und Busacca dem Zweifel Raum, daß Levaditi und Mitarbeiter mit rein zufällig das Herpesvirus enthaltendem Material gearbeitet haben.

Während Luger und Lauda, sich sehr zurückhaltend über die Levaditische Lehre aussprechen, erklärten sich Flexner und Amoss, Ford und Amoss, Veratti und Sala, Danilo und Stroe als Gegner derselben. Ottolenghi, Brotzu und D'Antona isolierten aus dem Hirn von Kaninchen, denen Zerebrospinalflüssigkeit von normalen oder encephalitischen Individuen inokuliert worden war, einen kleinen, filtrierbaren und für dieses Tier virulenten Coccobazillus, und meinen deshalb, daß dieser Keim in latenter Zustand gelebt habe und durch das Trauma mobilisiert worden sei. Nach diesen Autoren würde daher der Spezifitätswert der durch die vorausgehenden Untersucher hervorgerufenen experimentellen Encephalitis erschüttert.

* * *

Wie bereits erwähnt, ergibt sich aus den Untersuchungen von Maggiore und Sindoni, Sindoni und Misasi, Leone und Gerbasi die Züchtbarkeit des Encephalitisvirus, das nach den morphologischen und biologischen Eigenschaften für identisch mit dem von Flexner und Noguchi beschriebenen Keim der Poliomyelitis gehalten wurde, in dem Noguchischen Nährboden.

Wir haben daher gedacht, daß die eventuelle Uebertragung des Herpesvirus in analoge Kulturböden und das Studium desselben ein wertvolles Mittel für den Vergleich zwischen diesen verschiedenen Stämmen und für die einem jeden derselben in der Ätiologie dieser krankhaften Kundgebungen beizumessende Bedeutung abgeben könnte.

Auf dem XI. italienischen Kongreß für Kinderheilkunde im Oktober 1924 wurden von uns die bei den ersten Versuchen der Uebertragung des Herpesvirus in Kultur erzielten Resultate synthetisch dargelegt. Dabei kamen wir zu dem Schluß, daß dieses in Anaërobie züchtbar war, daß es sich auch in Kultur ultramikroskopisch zeigte; daß die erzielten Kulturen von den bis dahin in der Klinik mit Encephalitismaterial hergestellten durch den verschiedenen mikroskopischen Befund der Kulturen und durch das verschiedene histologische Bild abwichen, das bei experimentell infizierten Kaninchen erzeugt wurde.

Die Versuche sind fortgeführt worden, und über sie wollen wir ausführlich berichten.

Zwecks Klärung der uns gestellten Aufgabe studierten wir unter dem ätiologischen Gesichtspunkt 10 Fälle von einfachem Herpes, 5 Fälle von Encephalitis epidemica und 3 Fälle von Poliomyelitis anterior acuta.

Bei Ausführung dieser Untersuchungen hatten wir im Auge:

- 1) die Möglichkeit, die verschiedenen Viren direkt vom Menschen auf die Versuchstiere zu übertragen;
- 2) die Möglichkeit, die Keime der fraglichen Krankheiten in Kultur zu erhalten;
- 3) den Vergleich der durch Inokulation menschlichen Materials verursachten pathologisch-anatomischen Läsionen mit den durch die Kulturkeime erzeugten;
- 4) die Anwesenheit von Antikörpern gegen die von uns versuchten Kulturen im Blutserum der natürlich oder experimentell infizierten Organismen.

Wie berichten zunächst über die bei jeder Versuchsgruppe eingeschlagene Technik und führen dann bei Darlegung der verschiedenen Versuche des leichteren Verständnisses wegen sämtliche von Fall zu Fall angestellten Untersuchungen auf, wobei nur die kulturellen und serologischen Untersuchungen eine gesonderte Darlegung erfahren sollen.

Die verschiedenen Befunde werden nach der bereits angegebenen Reihenfolge der verschiedenen untersuchten Punkte besprochen werden.

Verwendetes Material.

I. Das zur direkten Uebertragung des Virus vom Menschen auf Tiere bevorzugte Material war:

- a) bei den Herpesfällen:
 - 1) Zerebrospinalflüssigkeit,
 - 2) Bläscheninhalt;
 - b) bei den Encephalitis- und Poliomyelitidenfällen:
 - 1) Zerebrospinalflüssigkeit,
 - 2) Hirn eines encephalitischen Kindes (1 Fall).
- II. Das zur Erzielung der Kulturen benutzte Material war:

- a) bei den Herpesfällen:
 - 1) durch Chamberland-Kerzen filtrierter Bläscheninhalt,
 - 2) nicht filtrierte Zerebrospinalflüssigkeit,
 - 3) Blut (1 Fall),
 - 4) Hirn von an Meningoencephalitis herpetica verendeten Tieren;
- b) bei den Encephalitis- oder Poliomyelitidenfällen:
 - 1) nicht filtrierte Zerebrospinalflüssigkeit,
 - 2) Hirn eines an Encephalitis verstorbenen Kindes, zerknetet und durch Chamberlandkerze L_2 filtriert,
 - 3) Hirn von an experimenteller Encephalitis verendeten Kaninchen.

Zur histopathologischen Beobachtung der encephalitischen Veränderungen bei den Tieren wurde im allgemeinen das Gehirn in toto fixiert und aus ihm mit aus verschiedenen Punkten (Großhirn, Kleinhirn, Pons, Medulla oblongata) entnommenen Stücken Präparate hergestelt. In einigen Fällen wurden solche auch aus anderen Organen (Leber, Niere) hergerichtet. In einem Fall von menschlicher Encephalitis (Fall 4) war es möglich, die vollständige Sektion vorzunehmen, und wurden aus verschiedenen Punkten des Gehirns Präparate hergerichtet.

Technik: Auf die Modalitäten der Entnahme der verschiedenen pathologischen Materiale aus den Patienten einzugehen, halten wir für unnütz, da sie nichts Besonderes bieten.

Als Kulturmedien wurden verwendet der Anaërobie-Nährboden von Di Cristina und der von Tarozi-Noguchi, die bei 37° in den Brutschrank gestellt wurden. Bei jedem Versuch vergewisserten wir uns konstant durch Kontrollüberimpfungen in die gewöhnlichen Nährböden und durch sorgfältige mikroskopische Beobachtung, daß sie nicht durch banale Keime verunreinigt waren.

Die bakterioskopische Untersuchung wurde mit nicht unter 10 Tage alten Kulturen angestellt, indem 4—5 ccm Kulturflüssigkeit lange zentrifugiert und die Ausstriche des so erhaltenen Sediments mit Methylenblau oder mit Leishmanscher Mischung gefärbt wurden.

Für die biologische Untersuchung der verschiedenen Viren und der Kulturen wurden junge Kaninchen (von 600 bis 1100 g Gewicht) oder selten Meerschwein-

chen benutzt, die einen guten Allgemeinzustand aufwiesen und mutmaßlich frei von spontanen ansteckenden Krankheiten waren.

Die Zerebrospinalflüssigkeit wurde ihnen subdural in Mengen von 0,50 bis 1 ccm oder korneal nach Konzentrierung in warmer Luft (30°) inokuliert; der Bläscheninhalt korneal; das Hirn des Kindes korneal und, nach sorgfältiger Zerknetung, so daß es zu einer homogenen und äußerst feinen Emulsion wurde, subdural.

Die Kulturen wurden korneal oder intrakraniell inokuliert. Im ersten Fall wurden 4—5 ccm Kultur in warmer Luft (ca. 30°) kondensiert und dann nach Skarifikation der Hornhaut die Inokulation vorgenommen. Zuweilen wurden zwischen den zwei Lidern einige Nähte angelegt, so daß die Lidspalte ungefähr 24 Std. geschlossen gehalten wurde und dadurch das Material länger in direktem Kontakt blieb. Diese Methode wurde jedoch nur im Anfang befolgt, da sie keinerlei besonderen Vorteil aufwies.

Für die subdurale Inokulation wurden 4—5 ccm Kultur zuerst leicht zentrifugiert, um die organischen Partikel (Reste von roten Blutkörperchen, Organfetzchen) des Nährbodens zu entfernen. Darauf wurde länger und rascher zentrifugiert. Das so erhaltene Sediment wurde in kleinen Mengen (ca. $\frac{1}{2}$ ccm) steriler physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und Kaninchen inokuliert.

Die inokulierten Kaninchen wurden bis zum Tode oder, falls sie überlebten, durch einen sehr langen Zeitraum sorgfältig überwacht. Wir vergewisserten uns, daß sie täglich die nötige Nahrung zu sich nahmen, und keine Ursachen dazwischentraten, die den Ausgang der Versuche fälschen konnten. Bei jedem verendeten Tier wurde eine sorgfältige Sektion vorgenommen, um das Vorliegen spontaner Krankheiten der Tiere auszuschließen, und konstant wurde die bakteriologische Kontrolle des Herzblutes und bei vielen des Gehirns in den gewöhnlichen Nährböden ausgeführt.

Die Versuche, bei denen nachgewiesen wurde, daß andere Elemente als die von uns hervorgerufenen dazwischengetreten waren, blieben natürlich unberücksichtigt.

Die Stücke für die histologische Untersuchung wurden in Orthscher Lösung fixiert und die Schnitte mit Hämalaun-Eosin gefärbt.

Die Antigene für die Proben der Komplementfixierung wurden derart hergestellt, daß die verschiedenen Kulturflüssigkeiten durch warme Luft (40°) ausgetrocknet und das erhaltene Material mit einer Menge 95proz. Alkohols, gleich $\frac{1}{10}$ des ursprünglichen Flüssigkeitsvolumens, extrahiert wurde. Nach einer Woche Brutschrank bei 37° wurde filtriert und dann dosiert. Hierbei und bei den Versuchen der Fixierung wurden die Technik und die Kriterien beobachtet, die bei dieser Art von Experimenten beim Arbeiten mit alkoholischen Antigenen gewöhnlich befolgt werden. Die Menge des untersuchten Serums betrug 0,30 ccm; die verwendeten Antigene waren 4: Herpes Di Cristina, Herpes Noguchi, Encephalitis Di Cristina und Encephalitis Noguchi.

I. Kulturelle Untersuchungen.

Änderungen in der Durchsichtigkeit der Kulturen (nach ca. 1 Woche vom Boden der Röhrchen ausgehende Trübung, und späterhin feiner körniger Niederschlag an den Wänden) wurden konstant im Nährboden von Di Cristina und fast immer in dem von Tarozzi-Noguchi beobachtet. Doch hat die Kontrolle mit im Brutschrank bei 37° gehaltenen Röhrchen mit sterilem Nährboden die Möglichkeit ähnlicher Veränderungen, wenn auch von geringerem Grade, erkennen lassen. Manchmal aber sind die Kontrollen des Noguchischen Nährbodens vollkommen klar geblieben, auch wenn sie einige Monate lang im Brutschrank bei 37° gehalten wurden.

Die mikroskopische Untersuchung der Kulturen hat uns interessante Erscheinungen zu erkennen gegeben. Sowohl bei den nach dem XI. Kongreß für Kinderheilkunde gemachten Ueberimpfungen als in den früher erhaltenen Herpeskulturen, aber bei späteren Generationen, konnten wir sprungweise die Anwesenheit von feinen Körnern von verschiedener Größe verzeichnen, die aber immer kleiner als der Fränkelsche Diplokokkus waren, manchmal stark gefärbt, von rundlicher oder länglicher Form, isoliert oder in Paaren und kleinen Häufchen, ausnahmsweise in kurzen Kettchen. Diese Granula wurden in den nicht beschickten Kontrollnährböden nicht beobachtet und waren am zahlreichsten in den Kulturen kürzlicher Isolierung; manchmal waren sie in Kulturen 1. oder 2. Generation sogar sehr reichlich. Sie waren sowohl in den Herpeskulturen, wie in den Encephalitis- und Poliomyelitis-kulturen vorhanden. In diesen nahmen sie einige Male ähnliche Formen an wie der Noguchische Keim, andere Male fehlten sie vollständig.

II. Experimentelle Infektion mit direkt dem Menschen entnommenem Virus und mit Kulturen.

Der beste Beweis für das tatsächliche Vorhandensein des Virus in unseren Kulturen mußte, da uns der morphologische Befund wegen seiner Merkmale nicht viel nutzen konnte, durch die eventuelle Erzeugung jener nämlichen krankhaften Veränderungen bei empfänglichen Tieren gegeben werden, die durch Injektion von Material von Kranken (Zerebrospinalflüssigkeit, Bläscheninhalt) erhalten werden können. Zu diesem Zweck und um auch persönlich die biologischen Eigentümlichkeiten der untersuchten Stämme studieren zu können, haben wir mit dem von den Kranken erhaltenen pathologischen Material gleichzeitig die Kulturen hergestellt und intrakranielle und korneale Inokulationen bei Kaninchen vorgenommen. So bekamen wir ein direktes Mittel zur Kontrolle der Krankheitsäußerungen und der durch die inokulierten Kulturen gesetzten anatomischen Veränderungen.

Diese Kulturen waren, wie sich aus dem Protokoll ergibt, stets vorgerückter Generation.

Wir wollen nun die angestellten biologischen Untersuchungen einzeln Fall für Fall, und zwar nach den verschiedenen Krankheiten geordnet, besprechen. Von jedem verendeten Tier wurden histologische Präparate hergestellt. Um jedoch häufige Wiederholungen zu vermeiden, sollen nur einige histologische Befunde mitgeteilt werden, und zwar besonders von jenen Tieren, die in vita keine deutlichen nervösen Erscheinungen gezeigt hatten.

Fälle von einfachem Herpes.

Die untersuchten Fälle von einfachem Herpes waren:

- I. Herpes symptomaticus labialis bei einem Bronchopneumoniker (Bläschen im Blütestadium).
- II. Herpes symptomaticus labialis bei einem Pneumoniker (Bläschen im Blütestadium).
- III. Herpes symptomaticus labialis bei einem Pneumoniker (Bläschen 5 Tage vorher aufgetreten, schon abgetrocknet).
- IV. Herpes febrilis labialis bei einem Erwachsenen (Bläschen im Blütestadium).
- V. Herpes febrilis labialis bei einem Erwachsenen (Bläschen im Blütestadium).
- VI. Herpes febrilis labialis bei einem Kinde (Bläschen im Blütestadium).
- VII. Herpes febrilis labialis bei einem Kinde (Bläschen im Blütestadium).
- VIII. Herpes symptomaticus labialis bei einem erblich syphilitischen Individuum mit Malaria tertiana primaverilis (Bläschen im Blütestadium).
- IX. Herpes febrilis labialis bei einem Erwachsenen (Bläschen im Blütestadium).
- X. Herpes febrilis auricularis bei einem Kinde (Bläschen im Blütestadium).

Fall I.

1) Material vom Menschen.

10. 4. 1924. Kaninchen 1. Intrakranielle Inokulation von Zerebrospinalflüssigkeit. Es überlebt, ohne erhebliche Symptome aufzuweisen.

10. 4. 1924. Kaninchen 2. Intrakranielle Inokulation von Zerebrospinalflüssigkeit. Nach 48 Std. rechtsseitige Hemiparese. Exitus nach weiteren 3 Std.

Bei der makroskopischen Untersuchung wird Hyperämie des Gehirns und bei der histologischen Untersuchung bedeutende Ueberfüllung der Gefäße der Hirnhäute und der grauen Substanz, perivaskuläre Infiltration, die an einigen Stellen vorwiegend aus neutrophilen polynukleären Zellen besteht, gefunden.

10. 4. 1924. Kaninchen 3. Korneale Inokulation von Bläscheninhalt. Nach 24 Std. Keratitis, nach 10 Tagen erhebliche nervöse Erscheinungen. Exitus nach 11 Tagen.

10. 4. 1924. Meerschweinchen 1. Intrakranielle Inokulation von Zerebrospinalflüssigkeit. Es werden keine bemerkenswerten nervösen Erscheinungen beobachtet. Exitus nach 4 Tagen.

Bei der Sektion wird bedeutende Hyperämie des Gehirns (vor allem Hirnhäute und graue Substanz) gefunden. Bei der histologischen Untersuchung werden spärliche Herde perivaskulärer Infiltration, häufiger kleinzellige Infiltrationsherde unter der Pia mater und dem ventrikulären Ependym konstatiert. Spärliche punktförmige Blutungen.

Es wurde serienweise Uebertragung versucht. Mit Hirn von Meerschweinchen 1 kam man subkutan zur 3., intrakraniell zur 5. Passage. Bei diesen Tieren wurden keine nervösen Erscheinungen, sondern nur starke Abmagerung beobachtet. Die pathologisch-anatomische Untersuchung der verendeten Tiere zeigte die gewohnten encephalitischen Läsionen.

2. Material aus Kulturen.

a) Intrakranielle Inokulationen.

7. 5. 1924. Kaninchen 9. Kultur in Noguchi aus dem Hirn des Kaninchens 2 (2. Generation). Keinerlei Krankheitszeichen, überlebt.

7. 5. 1924. Kaninchen 10. Kultur in DiCristina ebenfalls aus dem Hirn von Kaninchen 2 (2. Generation). Nach 48 Std. Tetraparese, dann Mydriasis mit Aufhebung des Lichtreflexes, Haarausfall, Tremor, spastischer Gang, bedeutende Gewichtsabnahme. Exitus nach 19 Tagen. (Mit Hirn von diesem Kaninchen wird Kaninchen 22 geimpft, das seit ca. 20 Tagen spastische Parese des linken Vorderbeines und sonst kein Symptom zeigt; es überlebt.)

25. 5. 1924. Kaninchen 21. Impfung mit demselben Stamm in Noguchi (3. Generation). Keine nervösen Zeichen. Gewichtsabnahme. Exitus nach 19 Tagen. — 6. 4. 1924. Kaninchen 26. Impfung mit demselben Stamm in DiCristina (4. Generation). Nach 15 Tagen Tetraparese; nach 24 Tagen Exophthalmus; bedeutende Gewichtsabnahme; Exitus nach 27 Tagen —

23. 12. 1924. Kaninchen 46. Impfung mit demselben Stamm in DiCristina (9. Generation). Exitus nach 4 Tagen. Nervöse Zeichen wurden nicht beobachtet. — Bei der histologischen Untersuchung des Gehirns der Kaninchen 21, 26 und 46 wird gefunden: Bedeutende Ueberfüllung der Gefäße der Hirnhäute und der grauen Substanz. Kleinzellige Infiltrationsherde unter Pia und Ependym; einschichtige perivaskuläre Muffe. — 14. 5. 1924. Kaninchen 11. Impfung mit Kultur aus dem Hirn des Meerschweinchens 1 in DiCristina (2. Generation). Mydriasis, starker Gewichtsverlust (von 1000 auf 480 g). Exitus nach 15 Tagen. Bei der pathologisch-anatomischen Untersuchung gewohnter Befund. — 31. 5. 1924. Kaninchen 24. Impfung mit Kultur aus dem Hirn von Kaninchen 4 in DiCristina (3. Generation). Ueberlebt.

b) Korneale Inokulationen (nicht angereicherte Kulturen).

20. 12. 1924. Kultur (8. Generation) in Noguchi aus Kaninchen 2: Resultat negativ. — 20. 12. 1924. Kaninchen 42. Kultur in DiCristina (8. Generation) aus Kaninchen 10: negativ. — 20. 12. 1924. Kaninchen 61. Kultur in Noguchi (10. Generation) aus Kaninchen 10: negativ. — 20. 12. 1924. Kaninchen 59. Kultur in DiCristina (11. Generation) aus Kaninchen 4: negatav.

c) Kutane Inokulationen beim Menschen (nicht angereicherte Kulturen).

5. 11. 1925. Kultur aus dem Hirn von Kaninchen 10 in Noguchi (10. Generation). Resultat negativ.

Aus den in diesem 1. Fall angestellten Versuchen ergibt sich, daß die Inkubationsperiode und die Dauer der experimentellen Krankheit bei intrakranieller Anwendung von Zerebrospinalflüssigkeit sehr kurz sein können (48 Std.). Dies ist offenbar für das Kaninchen 2, dessen histologischer Befund die dieser Krankheitsform eigenen Veränderungen zeigt, und aus dem zur Reproduktion

der Herpesencephalitis bei Tieren (Kan. 10, 21, 26, 46) befähigte Kulturen erhalten werden konnten.

Durch korneale Inokulation des Bläscheninhaltes wird die charakteristische Keratokonjunktivitis erhalten, die nach 24—48 Std. auftritt und einmal in einem Abstand von 9 Tagen Encephalitisäußerungen im Gefolge hatte. Bei einem Tier wurde Keratitis erhalten, und der Exitus trat ein, ohne daß Encephalitisymptome beobachtet worden wären.

Mit Kulturen verschiedener Herkunft wurden intrakraniell 7 Kaninchen geimpft. Von diesen kamen 5 nach einem Zeitraum von 4—27 Tagen zum Exitus, die Inkubationsperiode betrug 2—15 Tage und die Dauer der Krankheit bis zu 17 Tagen.

3 zeigten nervöse Erscheinungen, bisweilen imposant, bisweilen kaum angedeutet (Mydriasis, Gewichtsabnahme).

Bei 2 Tieren wurden keine wahrnehmbaren Symptome verzeichnet, es trat allein Gewichtsabnahme ein.

Die serienweise Uebertragung hatte unserer Ansicht nach positiven Erfolg von Kaninchen 2 auf Kaninchen 22. Offenbar aber war eine Abschwächung in der Virulenz des Stammes erfolgt.

Durch die korneale und kutane Inokulation war es uns nicht möglich, das Virus nachzuweisen, bei keiner der verschiedenen Proben aber waren die Kulturen angereichert worden.

Das histologische Bild kann als identisch bei den beiden Versuchsreihen (mit menschlichem und kulturellem Material) betrachtet werden und änderte sich auch nicht merklich je nach der Dauer der experimentellen Krankheit.

Fall II.

1. Material vom Menschen.

6. 1. 1924. Kaninchen 16. Subdurale Inokulation von Zerebrospinalflüssigkeit. Bedeutende Gewichtsabnahme (von 1000 auf 700 g) und nach 34 Tagen Tetraparese, tonisch-klonische Krämpfe zu Lasten der beiderseitigen Halsmuskeln. Exitus nach 35 Tagen durch Verschärfung der beschriebenen Erscheinungen. — 6. 5. 1924. Meerschweinchen 8. Intrakranielle Inokulation von Zerebrospinalflüssigkeit. Keine bemerkenswerte Erscheinung. Ueberlebt. — 6. 5. 1924. Kaninchen 17. Korneale Inokulation von Bläscheninhalt. Nach 48 Std. leichte Keratitis, die rasch heilt und darauf korneale Immunität gegen das aus Bläschen von anderen Tieren stammende Virus. Exitus nach 40 Tagen, nachdem es nur bedeutende Gewichtsabnahme (von 720 auf 500 g) gezeigt hatte. Histologischer Befund: hämorrhagische und mononukleäre Infiltrationsherde in der Hirnsubstanz, Mäntel perivaskulärer Infiltration. — 6. 5. 1924. Meerschweinchen 9. Korneale Inokulation von Bläscheninhalt. Nach 48 Std. leichte Keratitis, die rasch verschwindet; überlebt.

2. Material aus Kulturen.

a) Intrakranielle Inokulation.

6. 6. 1924. Kaninchen 27. Impfung mit Kultur aus dem Blut des Patienten in DiCristina (2. Generation). Nur Gewichtsabnahme. Exitus nach 14 Tagen. In der weißen Substanz zerstreute Blutungen. Hyperämie der grauen Substanz. Perivaskuläre Infiltration mit mononukleären Zellen. — 29. 8. 1924. Kaninchen 31. Impfung mit Kultur aus dem Blut des Patienten in Noguchi (4. Generation, 40 Tage). Nach ca. 20 Tagen Gewichtsabnahme. Nach 45 Tagen Exophthalmus, vordere Paraplegie wird Tremor, später hintere spastische Paraparese. Exitus nach 64 Tagen. Bei der histologischen Untersuchung des Gehirns: zerstreute hämorrhagische Infiltrationen, subpiale hämorrhagische Infiltration und solche mit poly- und mononukleären Zellen. Niere: Verdickung der Kapsel. Blutungen in der Bowmanschen Kapsel. In einigen Harnkanälchen wird Blut angetroffen. Das Epithel der Harnkanälchen ist streckenweise abgeschilfert und streckenweise nekrotisch (gleichmäßig rot gefärbt). Blutgefäße bedeutend mit Blut überfüllt. — 3. 12. 1924. Kaninchen 49. Impfung mit Kultur aus der Zerebrospinalflüssigkeit in Noguchi (9. Generation, 14 Tage). Exitus nach 29 Tagen. Kein nervöses Symptom. Pathologisch-anatomischer Befund: Bedeutende Hyperämie. Blutungen. Viele kleine Gefäße sieht man klar zerrissen. Subpiale hämorrhagische Infiltration. Spärliche perivaskuläre Infiltrate.

b) Korneale Inokulation.

20. 12. 1924. Kaninchen 43. Impfung mit Kultur aus Zerebrospinalflüssigkeit in Noguchi (10. Generation). Negativ. — 24. 1. 1925. Kaninchen 57. Impfung mit Kultur aus dem Hirn von Kaninchen 27 in Noguchi (7. Generation). Negativ. — 24. 1. 1925. Kaninchen 62. Impfung mit Kultur aus dem Blut des Patienten in DiCristina (11. Generation). Negativ.

c) Kutane Inokulation beim Menschen.

5. 2. 1925. Impfung mit Kultur aus Zerebrospinalflüssigkeit in Noguchi (10. Generation). Negativ bei 2 Individuen.

Bei diesen Versuchen ist zu bemerken, daß die Meerschweinchen sich weniger empfindlich für die Wirkung des Virus zeigten, daß ein Kaninchen, das eine charakteristische experimentelle Herpeskeratitis bekommen hatte, nach einem langen Zeitraum zum Exitus kam, ohne in die Augen fallende nervöse Symptome aufgewiesen zu haben. Die histologische Untersuchung des Gehirns zeigte bei diesem Fall das Vorhandensein der der Herpesencephalitis eigenen mikroskopischen Veränderungen.

Bei dem Versuch des Kaninchens 31, das mit alter Kultur (40 Tage) geimpft worden war, entstand eine deutliche Erkrankung mit ziemlich chronischem Verlauf. Die pathologisch-anatomische Untersuchung der Niere ließ uns die Anwesenheit von hämorrhagischen und degenerativen Läsionen zu Lasten der Glomeruli und der Harnkanälchen erkennen. Weitere intrakranielle Kulturinokulationen führten die Tiere, die nur Gewichtsabnahme aufwiesen, zum Exitus. Die kornealen und kutanen Proben hatten negativen Erfolg.

Fall III.

1) Material vom Menschen.

24. 5. 1924. Kaninchen 18. Intrakranielle Inokulation von Zerebrospinalflüssigkeit. Nach 6 Tagen Exophthalmus und Strabismus. Das Tier überlebt. — 24. 5. 1924. Kaninchen 19. Intrakranielle Inokulation von Zerebrospinalflüssigkeit. Es verendet nach 14 Tagen, ohne nervöse Symptome aufgewiesen zu haben. Nur Gewichtsabnahme (von 650 auf 560 g). Bei der pathologisch-anatomischen Untersuchung wird angetroffen: Hyperämie der grauen und weißen Substanz. Hämorrhagische Herde. Seltene perivaskuläre Infiltrationsmängel. Verdickung des ventrikulären Ependyms. Die Infiltrationselemente bestehen aus mononukleären Zellen.

2. Material aus Kulturen.

a) Intrakranielle Inokulationen.

4. 9. 1924. Kaninchen 32 (750 g). Impfung mit Kultur (4. Generation) aus der Zerebrospinalflüssigkeit des Patienten in Noguchi mit Traubenzuckerzusatz. Nach ca. 15 Tagen Mydriasis, Exophthalmus, Tremor und dann Parese der Hinterbeine, bedeutender Gewichtsverlust. Exitus nach 27 Tagen. — 4. 9. 1924. Kaninchen 33 (1250 g). Impfung mit Kultur (4. Generation) aus der Zerebrospinalflüssigkeit des Patienten in DiCristina. Nach 25 Tagen Exophthalmus, oszillatorische Bewegungen des Kopfes, später Monoplegie des rechten Vorderbeines. Nach ca. 4 Tagen verschwinden diese Symptome. Gewicht 1150 g. Das Tier überlebt. — 17. 3. 1925. Kaninchen 81. Impfung mit Kultur aus dem Blut des Patienten in Noguchi (12. Generation). Fortschreitende Gewichtsabnahme, nach 23 Tagen Mydriasis, paretisch-spastischer Gang zu Lasten der Hinterbeine, der späterhin verschwindet. Exitus nach 3 Monaten im Zustande tiefer Kachexie. Bei der histologischen Untersuchung des Gehirns wird angetroffen: bedeutende Hyperämie, perivaskuläre Mängel einschichtiger Infiltration, punktförmige Blutungen.

b) Korneale Inokulationen.

20. 12. 1924. Kaninchen 44. Impfung mit Kultur aus dem Hirn von Kaninchen 19 (9. Generation) in DiCristina. Negativ. — 25. 1. 1925. Kaninchen 66. Impfung mit Kultur aus dem Blut des Patienten in DiCristina (10. Generation). Negativ. — 25. 1. 1925. Kaninchen 70. Impfung mit Kultur aus dem Hirn von Kaninchen 19 in DiCristina (12. Generation). Bildung von kleinen Bläschen und Exsudat.

c) Kutane Inokulation beim Menschen.

23. 5. 1925. Mit demselben Material wie bei Kaninchen 44 und 70. Bei nur einem Individuum: negativ.

Auch bei diesem Fall führt die Inokulation der Zerebrospinalflüssigkeit das Tier zum Exitus, ohne daß ausgeprägte nervöse Symptome verzeichnet worden waren. Der histologische Befund war jedoch charakteristisch. Die intrakranielle Inokulation der Kulturen hatte stets positives Resultat im Gefolge. Bei Kaninchen 33 entstand nur eine vorübergehende Erkrankung, und das Tier überlebte.

Bei den kornealen Proben entstand nur bei Kaninchen 70 eine leichte Keratokonjunktivitis.

Fall IV.

1. Material vom Menschen.

25. 5. 1924. Kaninchen 20. Korneale Impfung mit Bläscheninhalt. Nach 36 Std. Keratokonjunktivitis, die sich später unter Hinterlassung eines Leukoms zurückbildet. Nach 7 Tagen linksseitige spastische Hemiparese, die sich auch auf die Halsmuskeln erstreckt. Tonisch-klonische Krämpfe der Kaumuskeln. Manègebewegungen. Exitus 9 Tage nach der Inokulation. — 29. 5. 1924. Kaninchen 23. Korneale Impfung mit Bläscheninhalt. Nach 48 Std. Keratokonjunktivitis von mäßiger Stärke, die sich nach einigen Tagen wieder zurückbildet. Nach 17 Tagen Parese der Hinterbeine. Exitus nach 18 Tagen.

2) Material aus Kulturen.

a) Intrakranielle Inokulationen. — 13. 10. 1924. Kaninchen 36. Impfung mit Kultur aus dem Hirn von Kaninchen 20 in DiCristina (4. Generation von 24 Tagen). Nach 2 Tagen Exophthalmus und Anisokorie; nach 5 Tagen bedeutender Tremor der Vorderbeine, bedeutender Gewichtsverlust (von 800 auf 600 g). Exitus 8 Tage nach der Inokulation. Histologische Untersuchung des Gehirns: Wenig erhebliche Hyperämie, hämorrhagische Infiltrationsherde. Seltene perivaskuläre Infiltrationsmäntel. Subpiaie Infiltration. Die Infiltrationselemente bestehen aus mononukleären Zellen.

b) Korneale Inokulationen. 25. 1. 1925. Kaninchen 45. Mit Kultur aus dem Hirn von Kaninchen 23 in DiCristina (9. Generation), nach vorausgegangener Konzentrierung. Resultat negativ. — 25. 1. 1925. Kaninchen 65. Mit Kultur aus dem Hirn von Kaninchen 20 in DiCristina (8. Generation), nach vorausgegangener Konzentrierung. Nach 20 Std. Keratitis mit kleinen Bläschen und dickem Exsudat. Nach 48 Std. werden die Bläschen größer. Bindehautinjektion. Heilung nach 4 Tagen unter Zurückbleiben eines leichten Leukoms.

Serienweise Uebertragung. 26. 1. 1925. Kaninchen 67. Korneale Impfung mit Material aus der Hornhaut von Kaninchen 65. Nach 24 Std. rahmiges Exsudat, nach 3 Tagen Bildung spärlicher Bläschen, die einige Tage bestehen bleiben.

c) Kutane Inokulationen. — 5. 2. 1925. Bei vier Kindern wurden mittels Skarifikation der Haut der Oberarme Inokulationen von Kultur aus dem Hirn von Kaninchen 20 in DiCristina (8. Generation) vorgenommen. Nach 24 Std. Rötung längs der Skarifikationslinien.

Die auf die mit demselben Material hervorgerufene Herpes-Keratokonjunktivitis folgenden Encephalitisymptome hatten bei den zwei Tieren verschiedene Intensität und Gang. Dies ist wahrscheinlich mit einer verschiedenen Empfänglichkeit für das Virus selbst in Zusammenhang zu bringen.

Die intrakranielle Impfung mit Kultur aus dem Hirn eines Kaninchens führte zu einer tödlichen Erkrankung von kurzer Dauer (8 Tage).

Die histologische Untersuchung des Gehirns wies nicht sehr imposante anatomische Veränderungen nach.

Die Hornhautprobe erzeugte bei dem Kaninchen 65 eine charakteristische, serienweis übertragbare Keratokonjunktivitis. Die kutanen Proben blieben negativ.

Fall V.

Material vom Menschen.

11. 11. 1924. Kaninchen 38. Korneale Inokulation von Bläscheninhalt. Nach 24 Std. Keratokonjunktivitis, die sehr stark wird und mit Hinterlassung eines Leukoms heilt. Nach 2 Monaten wird erneut mit Material (Bläschen) von Fall VII geimpft. Es entsteht weniger starke Keratokonjunktivitis als beim Kontrollkaninchen.

Da das Kaninchen überlebte, wurden keine Kulturen erhalten.

Fall VI.

1. Material vom Menschen.

a) Intrakranielle Inokulationen. 19. 11. 1924. Kaninchen 41. Inokulation von Zerebrospinalflüssigkeit. Keine nervösen Erscheinungen. Bedeutende Abmagerung und Exitus nach 37 Tagen. Sektion: Fibrinöse Pneumonie und eitrige Pleuritis. Wird ausgeschaltet.

b) Korneale Inokulationen. 19. 11. 1924. Kaninchen 40. Impfung mit Bläscheninhalt. Nach 24 Std. starke Keratitis, die 3—4 Tage fortschreitet und schließlich zur Perforation der Hornhaut führt. Das Tier überlebt, zeigt keine nervösen Erscheinungen.

2. Material aus Kulturen.

a) Intrakranielle Inokulation. 9. 3. 1925. Kaninchen 77. Mit Kultur aus der Zerebrospinalflüssigkeit des Patienten in DiCristina (6. Generation, 17 Tage). Exitus nach 13 Tagen. Es hatte gezeigt: Tremor des Kopfes, Erscheinungen motorischer Exzitation und Parese der Beine. Serienweise Uebertragung: Mit Hirnemulsion wird intrakraniell das Kaninchen 82 (22. 3. 1925, 720 g) geimpft. Keine erheblichen Erscheinungen zu Lasten des Nervensystems. Exitus nach 4 Monaten. Gewicht 750 g. Bei der makroskopischen Untersuchung nichts von Bedeutung. Bei der mikroskopischen Untersuchung bedeutende Hyperämie. Blutungen in der Dicke der grauen und weißen Substanz. Hämorrhagische und Rundzelleninfiltrate unter dem Ependym. Spärliche perivaskuläre Mäntel.

Bei diesem Fall überlebte das Kaninchen 40, obwohl es eine starke Keratitis gezeigt hatte, ohne weitere Krankheitszeichen gegeben zu haben. Die Kulturinokulation hatte positiven Erfolg, und der Versuch der serienweisen Uebertragung gab keine klaren Resultate, obwohl bei der mikroskopischen Untersuchung des Gehirns des nach langem Zeitraum verendeten Kaninchens bedeutende Veränderungen gefunden wurden.

Fall VII.

1. Material vom Menschen.

a) Intrakranielle Inokulation. 16. 1. 1925. Kaninchen 51 (1500 g). Inokulation von Zerebrospinalflüssigkeit des Patienten. Bedeutende Abmagerung. Nach 48 Tagen Tetraparese, am stärksten an den Hinterbeinen. Tremor des Kopfes und der Extremitäten, Miosis. Exitus 50 Tage nach der Inokulation. Gewicht 670 g.

b) Korneale Inokulation. 18. 1. 1925. Kaninchen 53. Inokulation von Bläscheninhalt. Nach 24 Std. Bläschenbildung, nach 48 Std. wird die Keratitis stärker und geht dann zurück. Am 19. Tage Exitus, nachdem Tetraparese aufgetreten war. Serienweise Uebertragung: Mit Hirn von Kaninchen 53 wird Kaninchen 69 in die Hornhaut geimpft. Es tritt keine Keratitis auf.

2. Material aus Kulturen.

a) Intrakranielle Inokulation. 12. 5. 1925. Kaninchen 94. Inokulation von Kultur aus Bläscheninhalt des Patienten in DiCristina (4. Generation, 26 Tage). Es verendet nach 76 Tagen, nachdem es 4 Tage lang Exophthalmus und Parese des hinteren Körperteiles aufgewiesen hatte. Histologischer Befund: Wenig bedeutende Hyperämie. Periarterielle Infiltrationsmäntel, viele mehrschichtig und alle aus mononukleären Elementen bestehend. Infiltrate unter dem Ependym. — 12. 5. 1925. Kaninchen 95. Inokulation von Kultur aus dem Hirn von Kaninchen 53 in DiCristina (5. Generation, 25 Tage). Nach 14 Tagen Mydriasis, Exophthalmus und Parese des hinteren Körperteiles. Diese Symptome halten 2 Tage an. 16 Tage nach der Inokulation Exitus. — 12. 5. 1925. Kaninchen 96. Inokulation von Kultur aus der Zerebrospinalflüssigkeit des Patienten in DiCristina (4. Generation, 26 Tage). Es verendet nach 53 Tagen, ohne bemerkenswerte Symptome aufgewiesen zu haben. Mantelförmige Infiltrate um die kleinen Venen der Rinde, vor allem aber entsprechend dem Mittelhirn. Diskrete Hyperämie des Hirns, erhebliche entsprechend dem Pons. Keine Blutungen.

b) Korneale Inokulationen. Kaninchen 94 und 96. Sie werden mit demselben Material geimpft, das ihnen intrakraniell beigebracht worden war. Resultat negativ.

Das Hirn des an Encephalitis im Anschluß an Herpeskeratitis verendeten Kaninchens hatte kein keratitogenes Vermögen.

Das negative Resultat der kornealen Inokulationen mit Kulturen, die intrakraniell ziemlich virulent waren, kann durch eine von dem Virus in den Kulturen erworbene größere neurotrope Affinität erklärt werden.

Fall VIII.

1. Material vom Menschen.

a) Korneale Inokulationen. 10. 2. 1925. Kaninchen 74. Impfung mit Bläscheninhalt. Nach 24 Std. Keratitis, nach 2 Tagen Tremor und Parese der Hinterbeine, nach 3 Tagen Exitus. — 13. 2. 1925. Kaninchen 75. Impfung mit eingetrockneter Zerebrospinalflüssigkeit. Nach 24 Std. ganz leichte Keratitis und Bildung einiger Bläschen. Das Tier überlebt.

2. Material aus Kulturen.

a) Korneale Inokulationen. 16. 6. 1925. Kaninchen 99. Impfung mit Kultur aus dem Herpesbläscheninhalt des Patienten in DiCristina (5. Generation, 16 Tage). Resultat negativ. — 16. 6. 1925. Kaninchen 100. Impfung mit Kultur aus Zerebrospinalflüssigkeit des Patienten in DiCristina (6. Generation, 16 Tage). Resultat negativ.

b) Intrakranielle Inokulationen. 16. 6. 1925. Kaninchen 100. Impfung mit demselben Material (Zerebrospinalflüssigkeit, DiCristina, 6. Generation, 16 Tage). Keine bemerkenswerten Erscheinungen. Exitus am 28. 8. an interkurrenter Infektion. Histologische Präparate negativ.

Bei diesem Fall ist in bezug auf die anderen von neuem der rasche Verlauf der Encephalitis beim Kaninchen 74 und die Tatsache bemerkenswert, daß durch korneale Inokulation von Zerebrospinalflüssigkeit eine mäßige Keratitis erzeugt wurde. Die Kulturübertragung des virulenten Materials ist dieses Mal, nach den angestellten Versuchen zu urteilen, nicht gelungen.

Fall IX.

1. Material vom Menschen.

a) Korneale Inokulation. 6. 3. 1925. Impfung mit Bläscheninhalt. Nach 24 Std. Keratitis mäßigen Grades, nach 6 Tagen verallgemeinerte Parese. Exitus nach 7 Tagen. Serienweise Uebertragung: Kaninchen 78 (13. 3.) wird korneal am rechten Auge mit Hirn von Kaninchen 76 geimpft. Es entsteht keine Keratitis. Gleichzeitig wird am linken Auge Hornhautexsudat desselben Kaninchens 76 inokuliert. Nach 24 Std. entsteht Keratitis mäßigen Grades, die später zurückgeht. Nervöse Symptome werden an dem Kaninchen, das überlebt, nicht verzeichnet.

Anmerkung. Die mit Filtrat des menschlichen Bläscheninhaltes versuchten Kulturen erlitten Verunreinigung. Es konnten daher keine Inokulationen mit kulturellem Material vorgenommen werden.

Bei diesem Fall ist zu bemerken, daß das Gehirn des an Encephalitis verendeten Kaninchens keine Keratitis hervorruft.

Fall X.

1. Menschliches Material.

a) Korneale Inokulation. 17. 3. 1925. Kaninchen 79. Impfung mit Bläscheninhalt. Nach 24 Std. starke Keratitis. Exitus nach 5 Tagen. Keine merklichen nervösen Erscheinungen. Serienweise Uebertragung: mit Hornhautexsudat von Kaninchen 79 wird Kaninchen 87 korneal geimpft. Nach 24 Std. Keratitis. Nach 9 Tagen Exitus. Keine merklichen Erscheinungen zu Lasten des Nervensystems. Pathologisch-anatomischer Befund der Kaninchen 78 und 87: Es werden die charakteristischen Encephalitisläsionen angetroffen.

2. Kulturelles Material.

a) Intrakranielle Inokulation. 16. 6. 1925. Kaninchen 102 (1200 g). Impfung mit Kultur aus dem Hirn von Kaninchen 87 in DiCristina (4. Generation, 16 Tage). Nach 15 Tagen Exophthalmus und Anisokorie ($R > L$). Nach weiteren 2 Tagen Parese des Vorderkörpers, die nach 2 Tagen verschwindet. Erhebliche Abmagerung. Exitus nach 45 Tagen. Sektion: Hyperämie des Gehirns. Histologische Untersuchung: Perivaskuläre und subpiale Infiltrationsmängel.

b) Korneale Inokulationen. 16. 11. 1925. Kaninchen 102. Impfung mit demselben Material wie intrakraniell. Nach 48 Std. leichte Keratitis mit Bläschenbildung, rahmigem Exsudat, faszikuläre Hyperämie der Conjunctiva bulbi. Die Bläschen werden später deutlicher und halten weitere 24 Std. an. Keine nervösen Erscheinungen. — 16. 6. 1925. Kaninchen 101. Impfung mit Kultur aus dem Hirn von Kaninchen 87 in Noguchi (4. Generation, 16 Tage).

Nach 24 Std. rahmiges Exsudat mit Verschuß der Lidspalte. Keine Bläschen. Nach 48 Std. leichtes Opaksein der Hornhaut. Späterhin keine Erscheinungen zu Lasten des Nervensystems.

Auch bei diesem Fall trat in zwei Versuchen der Tod der Tiere wenige Tage nach der Keratitis ohne encephalitische Kundgebungen ein. Die mit Kulturen angestellten Proben gaben intrakraniell und korneal auch bei Verwendung derselben Kultur positive Resultate.

Aus den mitgeteilten Versuchen ist zu ersehen, daß die Zerebrospinalflüssigkeit von Individuen mit einfachem Herpes, zerebral inokuliert, die Tiere häufig ($\frac{5}{8}$) zum Exitus führte, und daß diesem oft ($\frac{3}{5}$) nervöse Erscheinungen vorausgingen.

Die korneale Inokulation derselben Zerebrospinalflüssigkeit, die in einem Fall versucht wurde, erzeugte typische Keratokonjunktivitis mit Bläschen.

Korneale Inokulation von Bläscheninhalt erzeugte immer Keratokonjunktivitis und sehr häufig ($\frac{8}{10}$) tödliche Encephalitis.

Von den 20 mit Kultur (Di Cristina und Noguchi) verschiedener Herkunft geimpften Kaninchen kamen 16 zum Exitus und 4 überlebten. Die Mehrzahl der verendeten zeigte in vita Symptome zu Lasten des Nervensystems, andere ($\frac{5}{16}$) nur starke Abmagerung. Die Symptomatologie war bei den mit direktem Virus wie mit kulturellem Material geimpften nahezu gleich.

Die Reproduktion der Herpes-Keratokonjunktivitis gelang nur bei 4 Tieren von 18; niemals wurden Zeichen von Encephalitis wahrgenommen.

Sowohl die experimentell mit Kulturen hervorgerufene Encephalitis, wie auch die Keratitis war da, wo dies versucht wurde, serienweise übertragbar.

Die Inkubationsperiode der experimentellen, mit menschlichem Material oder Kultur hervorgerufenen Krankheit zeigte bei der Keratitis keinen erheblichen Unterschied. Nur war die Krankheit im zweiten Fall immer weniger stark und von kürzerer Dauer.

Bei intrakranieller Kulturinokulation war die Inkubationsperiode manchmal länger als mit Zerebrospinalflüssigkeit.

Encephalitisfälle.

I. 11 Jahre altes Kind. Vor 7 Tagen plötzlicher Schwindelanfall, darauf Hang zum Schlaf. Parese der rechtsseitigen Facialis inf., Dysarthrie.

II. 2 Jahre altes Kind mit Somnolenz, Tremor und seit einer Woche aufgetretenen verallgemeinerten Muskelkrämpfen.

III. 2 Jahre altes Kind mit Somnolenz und verallgemeinerter Parese seit 15 Tagen.

IV. 4 Jahre altes Kind, an kortikaler Form gestorben.

V. 8 Jahre altes Kind mit Encephalitis im Blütestadium. Ophthalmoplegia interior et exterior dextra. Parese des rechtsseitigen Facialis.

Fall I.

1. Menschliches Material.

a) Intrakranielle Inokulation. 6. 2. 1925. Kaninchen 71 (600 g). Inokulation von Zerebrospinalflüssigkeit. Es verendet nach 19 Tagen, ohne Erscheinungen zu Lasten des Nervensystems noch Abmagerung gezeigt zu haben (Coccidiosis der Leber; wird nur für den histologischen Hirnbefund verwertet).

b) Korneale Inokulation. 9. 11. 1924. Kaninchen 74. Inokulation von eingetrockneter Zerebrospinalflüssigkeit. Es entsteht keine Keratitis.

2. Kulturelles Material.

a) Intrakranielle Inokulation. 20. 7. 1925. Kaninchen 107 (700 g). Inokulation von Kultur aus der Zerebrospinalflüssigkeit des Patienten in Noguchi (6. Generation, 24 Tage). Exitus nach 37 Tagen. 2 Tage vorher oszillatorische Bewegungen des Kopfes von vorn nach hinten.

b) Korneale Inokulation. Kaninchen 107. Impfung mit demselben Material. Es entsteht keine Keratitis.

Histologische Befunde. Kaninchen 71: Subpiaie und subependymale perivaskuläre Infiltrate, einschichtig, aus Rundzellen bestehend. Keine Blutungen.

Kaninchen 107: Hyperämie. Spärliche hämorrhagische Infiltrate. perivaskuläre Infiltrate. Subpiaie und subependymale Infiltration von Zellen mit rundem Kern.

Die Inokulation von Zerebrospinalflüssigkeit erzeugte nur histologisch nachgewiesene encephalitische Läsionen, keine Keratitis. Die Inokulation von Kultur erzeugte Encephalitis, nicht aber Keratitis.

Fall II.

1. Menschliches Material.

a) Intrakranielle Inokulation. 20. 3. 1925. Kaninchen 84 (900 g). Inokulation von Zerebrospinalflüssigkeit. Keine merklichen Symptome zu Lasten des Nervensystems. Tod nach 21 Tagen. Serienweise Uebertragung: Mit Hirn von Kaninchen 84 wird intrakraniell das Kaninchen 91 (650 g) geimpft, das nach 6 Tagen Mydriasis und vordere spastische Paraplegie aufweist. Diese Symptome verschwinden nach 2 Tagen und 10 Tage nach der Inokulation verendet das Kaninchen.

b) Korneale Inokulation. 24. 3. 1925. Kaninchen 83. Impfung mit konzentrierter Zerebrospinalflüssigkeit. Nach 24 Std. mäßige Keratokonjunktivitis mit Bläschenbildung. Nach 11 Tagen verendet das Tier, ohne daß nervöse Erscheinungen beobachtet worden wären.

2. Kulturelles Material.

a) Intrakranielle Inokulation. 16. 7. 1925. Kaninchen 104. Inokulation von Kultur aus der Zerebrospinalflüssigkeit in Noguchi (5. Generation, 20 Tage). Nach 39 Tagen motorischer Erregungszustand und am Tage darauf Parese der Vorderbeine, die stationär 2 Tage bis zum Tode dauert. — 16. 7. 1925. Kaninchen 105. Inokulation von Kultur aus der Zerebrospinalflüssigkeit des Patienten in DiCristina (5. Generation, 20 Tage). Tod nach 42 Tagen. Symptome zu Lasten des Nervensystems wurden nicht beobachtet.

b) Korneale Inokulation. Kaninchen 104, Kaninchen 105. Impfung mit demselben Material wie bei der intrakraniellen Inokulation. Es entsteht keine Keratitis.

Histologische Befunde. Kaninchen 91. Deutliche und häufige perivaskuläre Infiltrationsmäntel, einschichtig, aus Elementen mit rundem Kern bestehend. Hämorrhagische Infiltrate. Infiltrate unter der Pia und dem Ependym.

Kaninchen 105. Ziemliche Hyperämie; spärliche subpiaie und subependymale mehrschichtige Rundzelleninfiltrate.

Kaninchen 104. Hämorrhagische Infiltrationen der Rinde, Ueberfüllung der feinen Gefäße der weißen Substanz, subependymale und perivaskuläre einschichtige Zellinfiltration.

Die in diesem Fall angestellten Untersuchungen haben die serienweise Uebertragbarkeit der experimentellen, durch intrakranielle Injektion von Hirnbrei erhaltenen Encephalitis erwiesen. Weiter zeigten sie die Möglichkeit, mit der Zerebrospinalflüssigkeit eine Keratitis mit den Eigenschaften der Herpeskeratitis zu erhalten, auf die der Tod des Tieres folgte, der wahrscheinlich auf die Wirkung des eingepfachten Virus zurückzuführen war (den histologischen Befund konnten wir nicht erheben).

Die Inokulation des aus den Kulturen entnommenen Materials erzeugte beim Kaninchen eine langsam verlaufende Krankheit, die bei einem Tier mit einer nervösen Phänomenologie einherging, bei dem anderen subdol verlief. Keratitis entstand nicht.

Fall III.

1. Menschliches Material.

a) Korneale Inokulation. 24. 3. 1925. Kaninchen 85. Impfung mit Zerebrospinalflüssigkeit. Nach 24 Std. Keratitis mit Bläschen. Nach 25 Tagen Tremor des Kopfes und Parese der Vorderbeine. Später Mydriasis. Tod 28 Tage nach der Inokulation.

2. Kulturelles Material.

a) Intrakranielle Inokulationen. 16. 7. 1925. Kaninchen 106. Inokulation von Kultur aus der Zerebrospinalflüssigkeit des Patienten in DiCristina (5. Generation, 20 Tage). Es verendet nach 21 Tagen, ohne nervöse Symptome gezeigt zu haben. — 20. 7. 1925. Kanin-

chen 108. Inokulation von Kultur aus dem Hirn von Kaninchen 85 in DiCristina (5. Generation, 24 Tage). Es verendet nach 18 Tagen, nachdem es Tremor des Kopfes mit Bewegungen von vorn nach hinten und Parese der Hinterbeine gezeigt hatte. Die Störungen waren 15 Tage nach der Inokulation aufgetreten und bis zum Tode stationär geblieben.

b) Korneale Inokulationen. 16. 7. 1925. Kaninchen 106. Impfung mit demselben Material wie intrakraniell. Nach 24 Std. Keratitis mit Opakein der Hornhaut und Bläschenbildung. — 20. 7. 1925. Kaninchen 108. Impfung mit demselben Material wie intrakraniell. Es entsteht keine Keratitis.

Histologische Befunde. Kaninchen 106. Perivaskuläre und subependymale Infiltration von Elementen mit rundem oder länglichem Kern; einige Blutungen. Hyperämie der grauen Substanz. — Kaninchen 85. Perivaskuläre und subependymale polyblastische Infiltration. Hyperämie, einige Blutungen.

Die korneale Inokulation von Zerebrospinalflüssigkeit erzeugte auch in diesem Fall Keratitis mit anschließender tödlicher Encephalitis.

Durch Inokulation von Kulturen wurde in einem Abstand von ca. 20 Tagen der Tod hervorgerufen, dem bei einem Tiere zerebrale Erscheinungen vorausgingen.

Die Keratitis wurde nur mit den Kulturen aus der Zerebrospinalflüssigkeit und nicht mit der Kultur aus dem an Encephalitis im Anschluß an Keratitis verendeten Kaninchen erhalten.

Fall IV.

1. Menschliches Material.

25. 3. 1925. Kaninchen 88. Korneale und intrakranielle Inokulation von zerknetetem Hirn. Keine Symptome zu Lasten des Nervensystems, keine Keratitis, nur bedeutender Grad der Abmagerung. Es verendet nach 17 Tagen.

2. Kulturelles Material.

a) Intrakranielle Inokulationen. 20. 7. 1925. Kaninchen 109. Inokulation von Kultur aus dem Hirn des Kindes in DiCristina (5. Generation, 24 Tage). Nach 37 Tagen Parese der Vorder- und Hinterbeine. Tod nach 40 Tagen. — 20. 7. 1925. Kaninchen 101. Inokulation von Kultur in Noguchi (5. Generation, 20 Tage). Es verendet nach 9 Tagen, nachdem es nur Exophthalmus gezeigt hatte.

b) Korneale Inokulation. Kaninchen 109. Impfung mit demselben Material wie intrakraniell. Es entsteht keine Keratitis.

c) Intravenöse Inokulation. 22. 7. 1925. Kaninchen 105 bis. Inokulation von 2 cem Kultur aus dem Hirn von Kaninchen 88 in Noguchi (5. Generation, 24 Tage). Es verendet nach 17 Tagen, nachdem es am 14. Tage Parese der Vorderbeine und des rechten Hinterbeines gezeigt hatte.

Histologische Befunde. Kaninchen 89: An Schnitten sowohl des Großhirns wie des Mittelhirns werden kleine Blutungen, ziemliche Hyperämie, Infiltration von Zellen mit rundem Kern um die feinen Gefäße, zuweilen unter der Pia gefunden. — Kaninchen 105 bis: Kleine Blutungen an der Dicke der grauen Substanz; einige mehrschichtige perivaskuläre Mäntel aus rundzelligen Elementen. Subpiale Blutungen. Bedeutende Hyperämie der weißen und grauen Substanz. — Kaninchen 109: Perivaskuläre und subpiale polyblastische Infiltration. Hyperämie der meningealen Gefäße und perivaskuläre Infiltration. Kleine Blutungen in der grauen und weißen Substanz um die kleinen Gefäße. — Kaninchen 101: An Schnitten des Pons werden ein- oder mehrschichtige perivaskuläre polyblastische Infiltrationsherde gefunden, bestehend aus rundkernigen oder polymorphkernigen Zellen. Einige Blutungen. Einige rundzellige Infiltrationsherde in der Dicke der weißen Substanz. Sehr starke Hyperämie in der Nähe des Aqueductus Sylvii mit kleinen hämorrhagischen Suffusionen. Rundzellige Infiltrationen unter dem Ependym des Aqueductus Sylvii.

Die Hirnsubstanz des an Encephalitis verstorbenen Kindes erzeugte, in die Hornhaut eingepflegt, keine Keratitiserscheinungen, führte aber das Kaninchen nach subduraler Injektion zum Exitus, ohne daß Symptome zu Lasten des Nervensystems verzeichnet worden wären.

Die Kulturen erzeugten keine Keratitis. Durch intrakranielle Inokulation derselben bekam man den Tod des Tieres nach 7 bzw. 9 Tagen. Im ersten Fall gingen deutliche Lähmungssymptome voraus.

Bei intravenöser Injektion der aus dem Hirn des Kindes hergestellten Kultur wurden nach 14 Tagen Zeichen von Tetraparese erhalten, auf die nach 3 Tagen der Tod des Kaninchens folgte.

Fall V.

1. Menschliches Material.

22. 6. 1925. Kaninchen 103. Inokulation von konzentrierter Zerebrospinalflüssigkeit in die Hornhaut des rechten Auges und von Zerebrospinalflüssigkeit intrakraniell. Nach 24 Std. Keratokonjunktivitis. Nach 37 Tagen Exitus, ohne daß nervöse Erscheinungen vorausgegangen wären.

2. Kulturelles Material.

5. 1. 1926. Kaninchen 112. Inokulation von Kultur aus der Zerebrospinalflüssigkeit des Kindes in Noguchi (6. Generation, 50 Tage) ins linke Auge und von derselben Kultur in Di-Cristina ins rechte Auge. Nach 24 Std. Keratokonjunktivitis am rechten Auge, die 48 Std. dauert und Hornhautpannus hinterläßt.

Serienweise Uebertragung: Kaninchen 113 wird mit von der Hornhaut des Kaninchens 112 abgeschabtem Material am rechten Auge geimpft. Nach 24 Std. charakteristische, obwohl schwache Keratokonjunktivitis.

Die Zerebrospinalflüssigkeit war auch für die Hornhaut pathogen. Die aus ihr hergestellte Kultur gab serienweise übertragbare Keratitis.

Aus dieser Gruppe von Versuchen ergibt sich, daß die Zerebrospinalflüssigkeit von Encephalitiskranken, in der akuten Periode der Krankheit entnommen und in die Hornhaut inokuliert, bei der Mehrzahl der Fälle (3 auf 4) eine Keratokonjunktivitis, ähnlich der Herpeskeratokonjunktivitis, aber von viel geringerer Intensität und Dauer erzeugte. Auf diese Keratokonjunktivitis folgten, nicht konstant, encephalitische Läsionen und in zwei Fällen der Tod des Tieres.

Die subdurale Inokulation von Zerebrospinalflüssigkeit erzeugte immer histologisch, aber nicht durch die Symptome nachgewiesene Encephalitisercheinungen, und zwar auch dann, wenn die Inokulation in die Hornhaut negativ ausfiel. Bei Inokulation von Hirn des an Encephalitis verstorbenen Kindes wurde der Tod des Kaninchens mit histologischen Läsionen des Gehirns von entzündlich-hämorrhagischem Typus erhalten. Dieses selbe Hirn hatte kein keratitogenes Vermögen.

Durch korneale Inokulation von Kultur wurde Keratitisbildung erhalten. Intrakraniell und intravenös wurde eine experimentelle Krankheit von encephalitischem Charakter reproduziert.

Die mit dem menschlichen Material und mit den Kulturen erhaltenen Resultate waren prinzipiell nicht verschieden. Die mit Kultur erhaltene Keratitis war weniger stark, die Inkubationsperiode und die Dauer der Krankheit variierten in den beiden Fällen nicht sehr. Die nervösen Symptome wurden bei intrakranieller Injektion von Zerebrospinalflüssigkeit nicht beobachtet, waren aber dagegen bei Kulturinjektion häufig.

Fälle von Poliomyelitis anterior acuta.

I. Kind mit linksseitiger Hemiparese seit 5 Tagen.

II. Kind mit Fieber, soporösem Zustand, linksseitiger Hemiparese seit wenigen Tagen.

III. Kind mit schlaffer Paraplegia inferior seit 10 Tagen.

Fall I.

1. Menschliches Material.

a) Intrakranielle Inokulation. 4. 2. 1925. Kaninchen 68 (600 g). Inokulation von Zerebrospinalflüssigkeit. In der ersten Zeit keine bemerkenswerte Erscheinung. Nach 2 Monaten Zeichen motorischer Erregung und Mydriasis, die 4 Tage anhalten. Tod nach 80 Tagen.

b) Korneale Inokulation. 4. 2. 1925. Kaninchen 72. Impfung mit kondensierter Zerebrospinalflüssigkeit. Es entsteht keine Keratitis.

2. Kulturelles Material.

a) Intrakranielle Inokulation. 16. 6. 1925. Kaninchen 98 (1000 g). Inokulation von Kultur aus der Zerebrospinalflüssigkeit des Patienten in DiCristina (5. Generation, 16 Tage). Keine nervösen Erscheinungen. Tod nach 20 Tagen.

b) Korneale Inokulation. 16. 6. 1923. Kaninchen 98. Impfung mit derselben Kultur wie subdural. Es entsteht keine Keratitis.

Pathologisch-anatomischer Befund (fast identisch bei den Kaninchen 68 und 98). Hyperämie des Gehirns. Bei der histologischen Untersuchung erscheinen die Gefäße der Rinde erheblich mit Blut überfüllt. Verdickung der Pia und Infiltration mit rundkernigen Zellen unter der Pia. Einige hämorrhagische Infiltrate, seltene einschichtige, perivaskuläre Infiltrate, bestehend aus rundkernigen Zellen.

In diesem Fall wurde bei Kaninchen durch subdurale Inokulation von Zerebrospinalflüssigkeit eine chronisch verlaufende Krankheit erzeugt, während durch Kontakt der konzentrierten Zerebrospinalflüssigkeit mit der skarifizierten Hornhaut des Tieres keine Keratitis hervorgerufen wurde. Analoge Resultate wurden bei Verwendung der Kultur erhalten.

Fall II.

1. Menschliches Material.

7. 5. 1925. Kaninchen 92. Korneale Impfung mit kondensierter Zerebrospinalflüssigkeit. Es entsteht keine Keratitis. Gleichzeitig wird Zerebrospinalflüssigkeit intrakraniell inokuliert. Das Tier überlebt, ohne bemerkenswerte Symptome zu zeigen.

2. Kulturelles Material.

20. 7. 1925. Kaninchen 100 (700 g). Korneale Impfung mit Kultur aus der Zerebrospinalflüssigkeit des Patienten in Noguchi (4. Generation, 20 Tage). Es entsteht keine Keratitis. Gleichzeitig wird von demselben Material intrakraniell inokuliert. Es verendet nach 39 Tagen, nachdem es schlaffe Parese des rechten Hinterbeines, die bis zum Tode stationär blieb, und bedeutenden Gewichtsverlust gezeigt hatte.

Pathologisch-anatomischer Befund. Hyperämie der Hirnhäute und der grauen Substanz. Einige punktförmige Blutungen in der weißen Substanz. Bei der mikroskopischen Untersuchung werden hämorrhagische Herde, isolierte Infiltrationsherde und perivaskuläre Infiltrationsmäntel gefunden.

Obwohl die direkt inokulierte Zerebrospinalflüssigkeit sich nicht als pathogen erwies, so führte doch die daraus erhaltene Kultur das Kaninchen mit deutlichen Zeichen der Lähmung zum Tod. Weder die Zerebrospinalflüssigkeit noch die Kultur erzeugte Keratitis.

Fall III.

30. 11. 1925. Kaninchen 111 (1050 g). Intrakranielle Inokulation von Zerebrospinalflüssigkeit und korneale Impfung mit derselben konzentrierten Flüssigkeit. Nach 18 Std. Keratokonjunktivitis mäßigen Grades mit einigen kleinen Bläschen. Das Tier überlebt.

7. 1. 1926. Kaninchen 114. Korneale Impfung mit Kultur aus der Zerebrospinalflüssigkeit in DiCristina (3. Generation, 50 Tage). Es entsteht keine Keratitis.

Die Zerebrospinalflüssigkeit gab in diesem Fall Keratitis, war aber zerebral nicht pathogen. In der Kultur konnte kein keratitogenes Virus nachgewiesen werden.

Die wenigen bei dieser Krankheit ausgeführten Versuche ermächtigen uns nicht Schlüsse zu ziehen. Wir beschränken uns daher darauf, nur die beobachteten Erscheinungen hervorzuheben.

Die Inokulation von menschlichem Material gab selten positives Resultat. In einem Fall entstand eine langsam verlaufende Krankheit mit geringen nervösen Symptomen, bei einem anderen Keratokonjunktivitis.

Die Inokulation von kulturellem Material auf intrakraniellern Weg führte die Tiere nach 20—39 Tagen zum Tod und in einem Fall traten deutliche nervöse Symptome auf. Die Kulturen erzeugten keine Keratitis.

Aus den erzielten Resultaten kann man entnehmen, daß die Kultur 2mal auf 3 gelang.

Besprechung der Resultate der biologischen Untersuchungen über die verschiedenen Viren.

Bevor wir zur Prüfung der wechselseitigen Bedeutung übergehen, die den bei jeder einzelnen Versuchsgruppe erzielten Resultaten beigelegt werden kann, wollen wir erörtern, ob der positive Ausfall der Tierinokulationen tatsächlich als auf dem in Kultur erhaltenen Viren beruhend betrachtet werden muß, oder ob die Möglichkeit von Bewertungsfehlern in Betracht zu ziehen ist.

Bei dieser Art von Untersuchungen sind die Elemente, die zur Erörterung kommen könnten, unserer Ansicht nach folgende:

1. daß die krankhaften Kundgebungen durch den Keim der spontanen Encephalitis der Kaninchen erzeugt wurden;

2. daß dieselben durch das ursprüngliche in einem geeigneten Milieu konservierte, aber sich nicht in demselben reproduzierende Virus des Menschen erzeugt wurden;

3. daß die chemischen Bestandteile des Nährbodens die beschriebenen Alterationen verursachten;

4. daß die von uns mit Kulturen erhaltene Keratitis der von Rose bei Kaninchen beobachteten und durch gramnegative Bazillen erzeugten spontanen Keratitis analog sein könnte.

Die erste Hypothese wird durch die makro- und mikroskopische Untersuchung der Gehirne der verendeten Tiere ausgeschlossen, die niemals das Vorliegen der für diese von den französischen Autoren¹⁾ so gut beschriebene Epizootie charakteristischen Läsionen nachwies. Außerdem ist die Tatsache zu erwähnen, daß kein anderes der für sonstige Untersuchungen verwendeten, aus derselben Zucht wie die unsrigen stammenden und in demselben Raum gehaltenen Kaninchen jemals Zeichen von Encephalitis aufwies.

Der zweiten ins Auge gefaßten Eventualität brauchen wir nicht Rechnung zu tragen, weil die Kulturen in ziemlich vorgerückter Generation verwendet wurden. In der Tat benutzten wir gewöhnlich die 4. oder 5. Passage in den Nährböden. Doch haben wir positive Resultate auch mit viel späteren Passagen (6., 8., 12. Generation) erhalten.

Schließlich ist auch die dritte vorgebrachte Wahrscheinlichkeit auszuschalten. Daß es sich um Proteinvergiftung oder irgendwie um an die chemische Natur des Nährbodens selbst gebundene Manifestationen gehandelt habe, muß wegen der im Verhältnis zum Gewicht des Tieres geringen Menge inokulierten Nährbodens, wegen des Ueberlebens einiger der intrakraniell geimpften Tiere, wegen des negativen Resultates der Mehrzahl der Versuche der Keratitisreproduktion bei den Kaninchen und schließlich wegen des Umstandes ausgeschlossen werden, daß die so bedingten experimentellen Krankheiten serienweise übertragen werden konnten.

In dieser Hinsicht kann uns auch der von einigen Autoren²⁾ erbrachte Nachweis nicht zweifelhaft machen, daß tödliche Kachexien oder Auftreten

1) Wir hätten gern diese Krankheit direkt studiert. Jedoch war es nicht möglich, sie bei den in unsere Beobachtung gekommenen Tieren anzutreffen. Ebenso wenig konnten wir erreichen, daß uns von dem Institut Pasteur in Paris, an das wir uns gewendet hatten, einige Stämme des Encephalitozoon cuniculi zugesandt wurde.

2) Piazza erhielt bei Meerschweinchen und Kaninchen durch intraperitoneale Inokulation von arteigenem oder artfremdem Hirn ($\frac{1}{4}$ oder $\frac{1}{2}$ Hirn, in physiol. Kochsalzlösung zerknetet)

von Parese und Paralyse durch parenterale Injektion von ärteigener Nervensubstanz erzeugt werden können. In der Tat haben wir bei unseren Versuchen, ganz abgesehen von allen anderen Betrachtungen, sehr kleine Mengen Hirnsubstanz und nur einmal injiziert.

In bezug auf die letzte von uns aufgeworfene Möglichkeit bemerken wir, daß die mikroskopische Untersuchung des Exsudates der Bläschen uns keine Anwesenheit von sichtbaren Keimen erkennen ließ, und daß wir niemals Keratitis bei den zu anderen Versuchen verwendeten und in demselben Raum gehaltenen Tieren verzeichneten.

Nachdem so ausgeschlossen ist, daß die oben ins Auge gefaßten möglichen Fehlerquellen im Spiele sein könnten, haben wir vorläufig noch das Resultat der Versuche mit den Kulturen in bezug auf das mit dem menschlichen Material erhaltene zu untersuchen.

Wir schicken zunächst voraus, daß wir mit letzterem experimentelle Keratitis und Encephalitis erhielten, sei es nun, daß wir Zerebrospinalflüssigkeit von Pat. oder Herpesbläscheninhalt verwendeten, und daß Symptomatologie und histologischer Befund in den positiven Fällen sowohl bei Herpes wie bei Encephalitis und Poliomyelitis nicht verschieden waren.

Der Erfolg der Kulturinokulationen zeigte uns in denselben bis zum Alter von 50 Tagen die Anwesenheit eines vitalen Quid mit gleichen Pathogenitätseigenschaften wie das im menschlichen Material vorhandene Quid. Die längere Inkubationsperiode und die geringere Stärke der Keratitis bei Verwendung von Herpeskulturen lassen sich sehr wohl durch eine abgeschwächte Virulenz des sich in nicht sehr geeigneten Lebensbedingungen befindenden Keimes erklären, während die geringe Anzahl positiver Resultate bei den Hornhautproben vielleicht durch eine geringe korneale Affinität der Virus in Kultur ihre Erklärung finden könnte.

In bezug auf die von uns beobachteten pathologisch-anatomischen Läsionen können wir zusammenfassend folgendes sagen.

Die Sektion der in den verschiedenen Versuchsgruppen verendeten Tiere ließ uns keine bemerkenswerten Alterationen zu Lasten der Bauch- und Brusteingeweide erkennen. Nur verzeichneten wir mit einer gewissen Häufigkeit, daß die Blase abnorm gedehnt und mit Urin gefüllt war. Aller Wahrscheinlichkeit nach war diese Erscheinung auf Parese des Detrusors zurückzuführen. Fast immer wurde eine bedeutende Ueberfüllung der meningealen und kortikalen Gefäße konstatiert; zuweilen auch kleine, punktförmige Blutungen in der Dicke der weißen Substanz, mit wechselndem Sitz. Die Hirnventrikel waren normal gedehnt. Trotz sorgfältigster Untersuchung fanden wir niemals Nekroserde der weißen und grauen Substanz.

Bei der mikroskopischen Untersuchung wurde verzeichnet: Hyperämie, hämorrhagische Infiltrationsherde, isolierte Zellinfiltrationsherde, subpial, subependymal oder in perivaskulären Mänteln. Letztere waren im allgemeinen

den Tod in einem Zeitraum von 3—49 Tagen. Die Tiere zeigten fortschreitenden Gewichtsverlust und Fieber. Bei der pathologisch-anatomischen Untersuchung wurde zu Lasten des Gehirns bedeutende Hyperämie, Neuronophagieerscheinungen und einschichtige perivaskuläre Infiltration von Elementen mit rundem Kern angetroffen.

Koritschoner und Schweinburg beobachteten bei experimentellen Untersuchungen über die Natur der Lähmungen, die beim Menschen nach Wutschutzimpfung auftreten können, bei mit wiederholten Injektionen (bis 14) von menschlicher Rückenmark- oder Nervensubstanzemulsion behandelten Kaninchen einen fortschreitenden Gewichtsabfall, der häufig zum Tode führte. Ein Teil dieser Tiere zeigte in den letzten Lebenstagen Lähmungen zu Lasten einer oder mehrerer Extremitäten. Bei der pathologisch-anatomischen Untersuchung wurden Läsionen des Rückenmarks, bestehend in Hyperämie, Blutungen in der grauen Substanz, perivaskulären Infiltraten, angetroffen.

einschichtig, oft nicht auf die ganze Gefäßwand ausgebreitet und bedeutender um die venösen Gefäße. Die Infiltrationselemente bestanden vorwiegend aus Lymphozyten und Polyblasten. Selten war es möglich, Plasmazellen und neutrophile polymorphkernige Zellen zu erkennen.

Was den Sitz anbetrifft, so waren diese Läsionen evident an Schnitten der Zerebrospinalachse in verschiedener Höhe, am erheblichsten im Telencephalon und Mesencephalon, geringer in der Medulla oblongata und noch geringer in den oberen Abschnitten des Rückenmarks.

Es war uns nicht möglich, die zuerst von Marinescu unter dem Namen „Neuronophagie“ beschriebene, später ausführlich von Esposito, Culetto, Lioni, Bartolotta illustrierte und häufig von Levaditi und Mitarbeitern bei der menschlichen und experimentellen Encephalitis angetroffene Erscheinung mit Sicherheit festzustellen.

Die oben mitgeteilten Daten erlauben uns nicht, eine Unterscheidung zwischen den verschiedenen hervorgerufenen experimentellen Krankheiten zu machen.

In der Tat variierte die Intensität der histologischen Läsionen und im allgemeinen das Aussehen der Encephalitis nicht je nach der Natur des Virus (Poliomyelitis-, Encephalitis-, Herpesvirus), sondern wahrscheinlich hingen sie von der verschiedenen Virulenz der einzelnen Stämme jedes Virus und vielleicht auch von dem Reaktionsvermögen des Tieres ab.

Dies wurde übrigens von Blanc und Caminopetros und von Nicolau und Poineloux durch die vergleichende Untersuchung verschiedener Stämme von genitalem Herpesvirus, die auch aus demselben Individuum, aber zu verschiedenen Zeiten entnommen wurden, klar nachgewiesen.

Außerdem wird aus der Durchsicht des Protokolles die von Marinescu und Draganescu ausgesprochene Meinung nicht bestätigt, daß nämlich das histopathologische Bild der experimentellen Herpesencephalitis in Abhängigkeit zu der Dauer der Krankheit stehe. Nach diesen Autoren überwiegen, wenn sie einen längeren Verlauf hat, als Infiltrationselemente Lymphozyten und Plasmazellen.

Der Befund der meningo-encephalitischen Reaktion, die das Kaninchen bei Inokulation eines filtrierbaren encephalitogenen Virus bietet, ermächtigt uns also nicht, einen experimentellen Krankheitstyp für ein jedes der untersuchten Viren festzulegen, um so mehr als ein ähnliches histologisches Bild schon vor längerer Zeit bei der Encephalitis angetroffen wurde, die durch Inokulation des Virus des kontagiösen Hühnerepithelioms und desjenigen der infektiösen Encephalitis des Pferdes hervorgerufen wird.

Kein besseres Kriterium kann die von den Tieren gebotene allgemeine Symptomatologie und besonders die zu Lasten des Nervensystems bilden, da sie uns keine erheblichen Unterschiede je nach den verschiedenen Krankheiten erkennen ließ. Die Tatsache sodann, daß bei zum Tode gekommenen Tieren keine Symptome zu Lasten des Nervensystems beobachtet wurden, ließe sich vielleicht häufig einer nicht kontinuierlichen Ueberwachung aus von unserem Willen unabhängigen Umständen beimessen.

III. Serologische Proben¹⁾. — Fixierung des Komplementes.

A. Untersuchungen an mit menschlichem (Kaninchen 38 und 40) und kulturellem (Kaninchen 48) Material geimpften Tieren.

1) Die Herpes zoster-Sera wurden während der eruptiven Periode entnommen; von den Herpes simplex-Sera nur das Serum X in derselben Periode, die übrigen ca. einen Monat nach der Eruption. Encephalitissera 5—15, Poliomyelitissera 16—30—90 Tage nach dem Auftreten der Krankheit.

	13. 12. 1924		13. 1. 1925		6. 2. 1925		
	Herpesantigen		Herpesantigen		Herpesantigen		Scharlach antigen
	Noguchi	Di Cristina	Noguchi	Di Cristina	Noguchi	Di Cristina	Noguchi
Kaninchen 38 (H. V) inoku- liert 11. 11. 24	— — —	— — —	+	— —	+	+	— — —
Kaninchen 40 (H. VI) inoku- liert 19. 11. 24	— — —	— — —	+	+	—	— — —	— — —
Kaninchen 48 (H. II) inoku- liert 30. 12. 24							

B. Untersuchungen an Serum von normalen Individuen und solchen mit Herpes simplex, Herpes zoster, Encephalitis und Poliomyelitis. Benutzte Antigene: Encephalitis (Noguchi und DiCristina), Herpes simplex (Noguchi und DiCristina).

	Herpes simplex-Antigen		Encephalitis-Antigen	
	Noguchi	DiCristina	Noguchi	DiCristina
Normalserum I	— — —	— — —	— — —	— — —
„ II	+ — —	+ — —	— — —	— — —
„ III	— — —	— — —	— — —	— — —
Herpes zoster-Serum I	— — —	— — —	— — —	— — —
Herpes zoster-Serum II	— — —	— + +	— — —	— — —
Herpes zoster-Serum III	— — —	— — —	— — —	— — —
Herpes simplex-Serum I	— — —	— — —	— — —	— — —
Herpes simplex-Serum II	+ + +	— — —	— — —	— — —
Herpes simplex-Serum III	+ + —	+ + —	— — —	— — —
Herpes simplex-Serum X	+ + —	+ + —	— — —	— — —
Poliomyelitis-Serum I	+ + +	+ + —	+ + +	— — —
Poliomyelitis-Serum II	— — —	— — —	+ — —	+ + +
Poliomyelitis-Serum III	— — —	— — —	+ + +	+ + +
Encephalitis-Serum I	— — —	— — —	+ + +	+ + +
Encephalitis-Serum II	— — —	— — —	+ + +	+ + +
Encephalitis-Serum III	— — —	— — —	— — —	— — —

Die Prüfung der bei den angestellten Proben erzielten Resultate führt, obwohl dieselben noch in allzu kleiner Zahl vorliegen, um endgültige Schlüsse daraus ziehen zu können, uns zu Folgerungen, die einigermaßen das Spezifitätsverhältnis zwischen dem von uns erhaltenen und bei diesen Untersuchungen benutzten kulturellen Material und Herpes-, Encephalitis- und Poliomyelitisvirus bestätigen.

Die zwei Kaninchen, deren Sera untersucht wurden, waren korneal mit Bläscheninhalt von Herpes simplex geimpft worden und hatten starke Keratitis gezeigt. Bei ihnen war die Reaktion in einem Abstand von 20 Tagen bis zu einem Monat nach der Inokulation negativ und nach einem längeren Zeitraum (2—3 Monate) in Gegenwart von Herpesantigen positiv. Diese Resultate stimmen mit dem überein, was in bezug auf die Zeit des Auftretens der Immunitätserscheinungen, in vivo bestimmt (Mariani), gefunden worden ist.

Daß es sich nicht um nichtspezifische Reaktionen zwischen Lipoiden gehandelt hat, wird durch die Tatsache bewiesen, daß die Reaktion negativ war bei Benutzung von Antigen, das aus Kulturen des Scharlachkeimes (DiCristina) in Noguchischem Nährboden erhalten war.

Der Umstand, daß die Reaktion bei den zwei Tieren konstant negativ war mit Antigen aus Kulturen in DiCristinaschem Nährboden, die sich vorher

bei der biologischen Probe (Inokulation in Kaninchen) aktiv gezeigt hatten, kann durch die Annahme erklärt werden, daß das zur Herstellung dieses Antigens verwendete Material außerordentlich keimarm oder geradezu erschöpft war, was wir angesichts der Unsichtbarkeit des Keimes nicht kontrollieren konnten. Diese Vermutung wird durch die Tatsache bestärkt, daß wir später mit anderen Kulturen in demselben Nährboden Antigen erhielten, das sich aktiv mit den menschlichen Seris zeigte. Auch konnten wir damals bei Dosierung des Antigens nicht die Kontrolle mit sicher positivem Serum machen, um uns über die Aktivität des Antigens selbst zu vergewissern, weil wir, am Anfang der Untersuchung stehend, kein Kriterium in der Hinsicht haben konnten.

Mit den menschlichen Seris haben wir folgende Resultate erhalten: drei der Sera von Individuen mit Herpes simplex reagierten mit den Herpesantigenen (Noguchi, Di Cristina); das vierte, das nur mit dem Antigen Noguchi versucht wurde, reagierte nicht. Keines der versuchten fixierte das Komplement in Gegenwart von Encephalitisantigen.

Es wurden drei Zoster-Sera versucht, nur eines reagierte teilweise mit Herpesantigen Di Cristina, die anderen waren vollständig inaktiv, sowohl in Gegenwart von Encephalitis- wie von Herpesantigen.

Von den drei versuchten Poliomyelitisseris reagierte eines positiv mit Herpesantigen und mit Encephalitisantigen Noguchi; zwei nur mit den Encephalitisantigenen. Zwei Sera von Kindern mit Encephalitis lenkten das Komplement nur in Gegenwart von Encephalitisantigen ab, das dritte ergab negatives Resultat. Von den drei untersuchten Normalseris zeigte nur eines leichte Hämolyseinhibierung mit den Herpesantigenen.

Wir glauben nicht, daß über den Spezifitätswert dieser Reaktionen in bezug auf das System Antigen-Antikörper Zweifel bestehen kann, und zwar sowohl wegen der Gewissenhaftigkeit, mit der bei den verschiedenen Proben die allgemeinen und besonderen Kontrollen beurteilt wurden, wie auch, und zwar besonders, wegen der Tatsache, daß dieselben Sera, gleichzeitig versucht mit mehreren Antigenen von verschiedener Natur, aber mit gleichen Nährböden hergestellt, verschieden reagierten.

Dies gesetzt, wollen wir untersuchen, welche Bedeutung den positiven Reaktionen gegen die Herpesantigene, schwach im Fall des Normalserums II und des Zoster II, stark im Fall des Serums des Encephalitikers VI, beizulegen ist. Dieselben lassen sich unserer Ansicht nach bequem erklären, wenn man annimmt, daß diese Individuen früher Herpesausschläge gehabt hatten oder Träger von Herpesvirus gewesen waren und deshalb noch Herpesantikörper im Kreislauf hatten. Diese Vermutung kann auch in dem Fall des Poliomyelitisserums gelten.

Zusammenfassend können wir somit behaupten, daß:

1. im Blutserum von Individuen mit Herpes simplex oder von experimentell infizierten Tieren die Anwesenheit von spezifischen Antikörpern gegen unsere Herpes simplex-Kulturen nachgewiesen werden konnte; und daß 2. im Blutserum von Individuen, die Encephalitis oder Poliomyelitis gehabt hatten, wenige Tage bis zu einigen Monaten nach Auftreten der Krankheit spezifische Antikörper für die Encephalitikulturen, aber nicht für die Herpeskulturen nachgewiesen werden konnten.

Allgemeine Betrachtungen.

Wir wollen nun den Wert untersuchen, der den in den einzelnen Versuchsgruppen erhaltenen Resultaten beizumessen ist, um schließlich zu einem Schluß

über die zwischen den verschiedenen untersuchten Viren bestehenden Beziehungen zu kommen.

Die Variabilität des morphologischen Befundes der Kulturen und die Besonderheiten desselben lassen sich durch die Annahme erklären, daß die studierten Keime in den verschiedenen Generationen eine mikroskopische Phase und eine ultramikroskopische aufweisen, welche letztere von einigen anderen Untersuchern nachgewiesen wurde. Oder aber man kann denken, daß die von uns gesehenen Granula nicht den Bakterienleib der Keime in Kultur bilden, sondern vielmehr aus einer besonderen Modifikation der in der Nährflüssigkeit suspendierten Proteinstoffe hervorgehen. So werden durch die Wirkung des Keimes auf die Bestandteile des Nährbodens einige Teilchen des letzteren färbbar und nehmen das von uns beschriebene Aussehen an.

Wir haben bereits erwähnt, daß Symptomatologie und anatomische Alterationen der hervorgerufenen experimentellen Krankheiten keine qualitativen Differentialmerkmale aufwiesen.

Müssen wir deshalb die Identität der drei Krankheiten annehmen? Wir glauben nicht. In der Tat können experimentelle Symptomatologien, die den von uns beobachteten analog sind, bei anderen Krankheiten und unter anderen Bedingungen erhalten werden. Es brauchte nur auf die spontane Encephalitis verwiesen zu werden.

Die anatomischen Läsionen, die wir bei den nach Inokulation der verschiedenen Viren zu Tode gekommenen Tieren antrafen, waren allerdings nahezu identisch, diese Tatsache ermächtigt uns aber nicht, zur Annahme einer biologischen Affinität zwischen diesen Viren selbst. In der Tat geht aus den Untersuchungen mit filtrierbarem Virus oder mit Kulturfiltrat, die von verschiedenen Autoren zur Feststellung des pathogenen Vermögens verschiedenen Materials für das Kaninchennervensystem ausgeführt wurden, hervor, daß dieses Tier auf nichtspezifische und somit nahezu gleiche Art auch gegenüber pathogenen Stoffen verschiedener Natur (kontagiöses Hühnerepitheliom usw.) reagiert, abgesehen dann davon, daß, wie erwähnt, nicht einmal der histologische Befund der menschlichen Encephalitis epidemica als charakteristisch betrachtet wird.

Jedoch können wir in unserem Fall behaupten, daß diese Läsionen auf einem vitalen toxischen Element beruhen und somit tatsächlich auf die Keime der verschiedenen von uns studierten Krankheiten zurückzuführen sind, weil solche Alterationen im Hirn von normalen Kaninchen und im Hirn von Tieren, die infolge intrazerebraler Einführung nichtorganischer toxischer Stoffe zum Exitus gekommen waren (Tarozzi), nicht angetroffen wurden. Daß sodann diese Läsionen durch die von uns studierten Viren bedingt wurden, läßt sich mit aller Wahrscheinlichkeit behaupten, denn bei den Kautelen, mit denen wir uns bei den Versuchen umgaben, können wir ausschließen, daß den Tieren andere Viren als die mutmaßlich in dem benutzten pathogenen Material vorhandenen inokuliert wurden.

Andererseits hingegen glauben wir, durch die ausgeführten Untersuchungen in den Besitz von Elementen gekommen zu sein, die uns zu einer von der ätiologischen Identität der fraglichen Krankheiten abweichenden Anschauung führen. In der Tat haben wir gesehen, daß sowohl im Fall der Encephalitis wie der Poliomyelitis nicht keratitogene Zerebrospinalflüssigkeiten in stande waren, Encephalitis hervorzurufen, und daß das Hirn des encephalitischen Kindes sich auf die gleiche Weise verhielt. Dies bedeutet, daß in dem benutzten Material encephalitogene und nicht keratitogene Viren vorhanden waren.

Ein Argument von größerem Wert ist aber unserer Ansicht nach das Verhalten von Encephalitis-, Poliomyelitis- und Herpeseris, das uns unter dem serologischen Gesichtspunkt eine enge Verwandtschaft zwischen Encephalitis

und Poliomyelitis und eine Verschiedenheit zwischen diesen beiden und Herpes simplex anzeigt.

Es kann auch nicht der Einwurf gegen uns erheben werden, daß wir hinsichtlich der Encephalitis mit genuinem Herpesvirus enthaltenden Kulturen gearbeitet haben. Vielmehr weisen uns die von uns nachgewiesenen Elemente auf eine Tatsache von einer gewissen Bedeutung, auf die bisher nicht aufmerksam gemacht wurde. Unsere encephalitischen Antigene waren mit Kulturen hergestellt worden, von denen mehrere keratitogenes Virus enthielten oder aus keratitogenem Material stammten. Jedoch war dieses keratitogene Virus nicht das Herpesvirus, insofern als die Sera von Encephalitikern und Poliomyelitikern nicht gleichzeitig das Komplement in Gegenwart von Herpes- und Encephalitisantigenen fixierten, sondern nur mit den Encephalitisantigenen; umgekehrt fixierten die Sera von Individuen mit Herpes simplex das Komplement nicht in Gegenwart von Encephalitisantigenen. Aus dieser Beobachtung ist mit großer Wahrscheinlichkeit zu entnehmen, daß Encephalitis- und Poliomyelitisvirus, obwohl sie keratitogen sind, nicht mit dem Herpesvirus identisch sind. Wir sagen mit großer Wahrscheinlichkeit, weil wir uns bei der nicht großen Zahl der Versuche wie auch wegen der Natur der Daten, auf die wir unsere Behauptung stützen, nicht berechtigt fühlen, für sie ohne weiteres einen absoluten Wert zu beanspruchen.

Auf diese Weise würde die Hypothese Levaditis geklärt, die sich auf die von seiner Schule erhaltenen Befunde stützt, und andererseits würden wir davor gewarnt, alle filtrierbaren Viren mit keratitogener und encephalitogener Eigenschaft als Herpesvirus zu betrachten. Daß sodann das Encephalitisvirus eine Variante des Herpesvirus sei, kann unserer Ansicht nach auf Grund der gegenwärtigen Kenntnisse über den Gegenstand weder behauptet noch geleugnet werden. Das Studium der Variabilität der Bakterien hat dazu geführt, daß in den letzten Jahren Keime nebeneinander gestellt wurden, die früher verschieden schienen. Es ist nicht ausgeschlossen, daß dasselbe auch hier der Fall sein kann, so lange dies aber nicht experimentell nachgewiesen sein wird, müssen wir das Herpesvirus als verschieden von dem Encephalitisvirus betrachten, während letzteres mit dem Keim der Poliomyelitis nahe verwandt oder geradezu identisch ist.

Schlüsse.

1. Es ist möglich, in katalytischen Anaërobie-Böden das Poliomyelitis-, Encephalitis- und Herpesvirus zu züchten. — 2. Das Encephalitis- und das Poliomyelitisvirus scheinen, obwohl sie keratitogen sein können, von dem Herpesvirus verschieden. — 3. Poliomyelitis anterior acuta und Encephalitis epidemica zeigen enge ätiopathogenetische Verwandtschaften. — 4. Die experimentellen, bei Kaninchen mit den drei untersuchten Viren erzeugten Encephalitiden weichen in der Symptomatologie und im pathologisch-anatomischen Befund nicht wesentlich voneinander ab.

Literatur.

NB. Von jedem Autor und über einen und denselben Gegensatz wird nur eine Arbeit, im allgemeinen die letzte, angeführt.

Albertoni, Relazione clinica sulla cosiddetta Enc. let. (Ann. di Clin. med. Bologna. 20. 2. 1920.) — Amoss, Journ. of exp. Med. Vol. 25. p. 545. — Bastiaie Busacca, L'infezione epitetica umana. Arch. Suisses de neur. et de psych. T. 15. 1925. F. 2; T. 16. F. 1.) — Baum, Ueber die Uebertragbarkeit des Herpes simpl. auf die Kaninchenhornhaut. (Derm. Wochenschr. 1920. Nr. 15.) — Blanc et Caminopetros, Quelques considérations sur l'Herpes. (Ann. Inst. Pasteur. 1924. p. 153.) — Boccolari, Policl. Sez. prat. 1921. — Bozzolo, Polioencefaliti

acute emorragiche da influenza. (Riv. cit. di clin. med. 1900 Nr. 3.) — Bull, The pathologic effect of streptococci from cases of poliomyelitis and other sources. (Journ. exp. Med. Vol. 25. 1917. p. 557.) — Cantani, Wirkung der Bakterieninokulation auf das Zentralnervensystem. (Ztschr. f. Hyg. 1896.) — Cartey, Criteria of transmission and cultivation of Encephalitis and allied viruses. (Brit. med. Journ. 1924. Dez.) — Cesaris-Demel, Sull'azione tossica e settica di alcuni microrganismi sul sistema nervoso centrale. (Mem. R. Accad. di Torino. 1899.) — Cerletti, Sulla neuronofagia ecc. (Ann. Ist. di Psich. d. R. Univ. di Roma. 1902-3.) — Chartier, L'encéphalite aigue non suppurée. (L'encéphale. 1908. p. 267.) — Da Fano, Herpetic meningo-encephalitis in rabbits. (Med. Scienc. Vol. 10. 1924. Nr. 5.) — Danila et Stroe, Recherches sur le virus de l'E. l. (Compt. rend. Soc. de Biol. 1923.) — Dies., A propos des essais de transmission des virus encéphalitogènes. (Ebenda. p. 271.) — Doerr, Ergebnisse der neuen experimentellen Forschungen über die Aetiologie des Herpes simpl. und des Zoster. (Zentralbl. f. Haut- u. Geschlechtskr. Bd. 13. 15, 16.) — Doerr und Berger, die Beziehungen der Enceph. epid. zum Herpes f. und zur Influenza. (Schweizer med. Wochenschr. 1922. p. 862.) — Doerr und Schnabel, Das Virus des Herpes facialis und seine Beziehungen zum Virus der Encephalitis epid. (Schweiz. med. Wochenschr. 1922. Nr. 20.) — Doerr und Vöchting, Recherches expérim. sur le virus de l'Herpes facialis. (Rev. gén. d'ophthalm. 1920. p. 409.) — Economo, v., Encephalitis lethargica. (Wien. klin. Wochenschr. 1916. Nr. 17, 19.) — Esposito, La neuronofagia. (Il manicomio u. Arch. di psich. 1912.) — Flexner, Epid. encephalitis and allied conditions. (Journ. of Amer. med. Assoc. 1923. p. 1688.) — Flexner and Amoss, Contribution to the pathology of experimental virus encephalitis. (Journ. exp. med. 1925. p. 357.) — Flexner and Lewis, Journ. of Amer. med. Assoc. 1909. p. 2095. — Flexner and Noguchi, Journ. exp. Med. 1913. Vol. 18.) — Fox and Rucker, Pennsylvania Dep. of Health Laboratory Report. 2. 2. 1911. — Ford and Amoss, Resultat of the injection of encephalitic spinal fluid into rabbits. (John Hopkins Hosp. Bull. 1924. p. 20.) — Fontana, Stato attuale delle nostre conoscenze intorno all'etiologia dell'herpes febrilis e genitales. (Minerva medica. 1922.) — Francioni, Soc. med. di Bologna. 1919. — Gaviati, Contributo sull'infezione erpetica sperimentale. Pathologia 15. 4. 1922.) Studi sassaresi. 1922. fasc. 2; und Tesi di docenza, Sassari 1923.) — Gerbasi e Giuffrè, Virus encefalitici e virus erpetici. (XI Congresso ital. di pediatria. Okt. 1924.) — Giuffrè, Ricerche sperimentali sul potere patogeno dei cosiddetti virus erpetici. (Ann. clin. med. e Med. sper. Anno 13. fasc. 2.) — Golgi, Il problema etiologico e patogenetico dell'erpete. (Milano 1925. Istituto editoriale scientifico.) — Grüter, Experimentelle und klinische Untersuchungen über den Herpes corneae. (Klin. Monatsbl. f. Augenh. 1920. S. 399.) — Hagelstam, Relation between influenza and nervous system with special reference to Enceph. epid. (Ref. in: Journ. of Amer. med. Assoc. Vol. 84. 1925. p. 156.) — Hoff und Silberstein, Uebertragbarkeit der Encephalitis der Hunde mit Eckscher Fistel. (Ztschr. f. d. ges. Med. 1925. p. 368.) — Kling, Davide et Siljenquist, (s. die versch. Mitt. in der Soc. de Biol. de Paris von 1921 bis 1924.) — Kooy, Ueber das Virus des fieberhaften Herpes. (Klin. Monatschrift f. Augenheilk. 1921. S. 75.) — Kolmer, Brown and Freese, Journ. of exp. Med. Vol. 25. p. 789.) — Koritschoner, Ueber die Ueberimpfung des Encephalitisvirus auf Hunde. (Wien. klin. Wochenschr. 1923. S. 385.) — Koritschoner und Schweinburg, Klinische und experimentelle Beobachtungen über Lähmungen nach Wutschutzimpfung. Ztschr. f. Immunitätsf. Bd. 42. 1925. S. 217.) — Knöpfelmacher, Med. Klinik. 1909. Nr. 44. — Kraupa, Zu Grüters ätiologischen Untersuchungen über den Herpes corneal. (Münch. med. Wochenschrift. 1920. S. 1236.) — Krookshank, The problems of encephalitis leth. (Brit. med. Journ. 1918. Okt. u. 1920. Dez.) — Isaicu et Telia, Etude sur l'herpes grippale. (Compt. rend. Soc. de Biol. 1922.) — Landsteiner und Papper, Zeitschr. f. Immunitätsf. 1919. — Landsteiner et Levaditi, Compt. rend. Soc. de Biol. 1919 p. 592. — Leiner und Wiesner, Wien. klin. Wochenschr. 1919. Nr. 49. — Levaditi, Mitt. in der Soc. de Biol. de Paris von 1920 an. — Levaditi et Harvier, Etude expérimentale de l'encéphalite dite lethargique. (Ann. Inst. Past. 1920. p. 911.) — Levaditi, Ectodermoses neurotropes (poliomyélite, encéphalite, herpes). (Mem. de l'Inst. Past. 1922. Masson. Paris.) — Levaditi, Nicolau et Schoen, L'étiologie de l'encéphalite épizootique du lapin. (Ann. Inst. Pasteur. 1924. p. 651.) — Leichtenstern, Ueber primäre akute Encephalitis. (Dtsch. med. Wochenschr. 1892.) — Leone e Gerbasi, Encefalite e poliomeleite. (XI Congresso di Pediatria. Mailand 1924.) — Lipschütz, Untersuchungen über die Aetiologie der Krankheiten der Herpesgruppe. (Arch. f. Derm. u. Syph. Bd. 136. 1921. S. 428.) — Lontie Bartolotta, Sulla cosiddetta neuronofagia. (Arch. di Anat. pat. e scienze affini. Palermo 1906.) — Lombardo, Encefalite sperimentale da mufte. (Riv. san. sicil. 1925. p. 993.) — Luger und Lauda, Zur Kenntnis des Encephalitisvirus und über dessen Beziehungen zum Herpes simplex. (Ztschr. f. d. ges. exp. Med. 1924. S. 1.) — Maggiora, Tombolato e Mantovani, Policl. sez. prat. 1920. — Maggiore e Sindoni, Etiologia dell'encefalite epidemica. (La Pediatria. 1920. p. 984; 1921. p. 680.) — Mariani, Stato attuale della questione degli erpeti. (Congr. di derm e sif. Florenz. Dez. 1924.) — Marinesco, Lésions des centres nerveuses produites par la toxine du bac. botulinus. (Presse méd. 1897.) — Marinesco et Draganesco, Recherches expérimentales sur le neutrotropisme du virus herpétique. (Ann. Inst. Past. 1923. p. 752.) — Mathers, Journ. Amer. med. Assoc.

30. Sept. 1916; Journ. of Inf. Dis. 1917. Januar.) — Mauthner, Zur Path. und Phys. des Schlaf, nebst Bemerk. über die Nona. (Wien. med. Wochenschr. 1890. Nr. 23—28.) — Micheli, L'encefalite epidemica in Lustig, Malattie infettive ecc. Mailand. Vallardi. — Mingazzini, Klinische und anatomo-pathologische Beiträge zum Studium der Encephalitis epidemica (lethargica). (Ztschr. f. d. ges. Neurol. u. Psych. Bd. 63. 1921.) — Moraweiff, Soc. de neur. et de psych. de Moscou. 10. Mai 1906. — Morelli, Ricerche sull' herpes. (Morgagni. 1902. Nr. 9.) — Monti, Policl. Sez. prat. 1920. — Nuzum and Herzog, Journ. amer. med. Assoc. 21. Okt. 1916. — Nicolau et Poincloux, Etude clinique et expérimentale d'un cas d'herpès recidivant du doigt. (Ann. Inst. Past. 1924. p. 977.) — Nicolau, Etude de quelques virus encéphaliques. Compt. rend. Soc. de Biol. 28. 2. 1925.) — Netter, L'encephalite lethargique epid. (Bull. Acad. méd. de Paris. 7. 5. 1918.) — Oppenheim, Berl. klin. Wochenschr. 1900. Nr. 10. — Orel und Silberstein, Ueber das Vorkommen von Encephalitisvirus im Nasenrachenraum gesunder Hunde. (Ztschr. d. ges. Med. 1925. p. 290.) — Ottolenghi, D'Antona e Tonietti, Sulla etiologia della encefalite letargica. (Policl. Sez. prat. 1920.) — Ottolenghi, D'Antona e Brotzu, Sulla trasmissibilità del virus dell' encefalite letargica al coniglio. (Boll. scienze med. 1924. maggio.) — Pagani-Cesa, Contributo alla conoscenza della malattia di Heine-Medin. (La Clin. Ped. 1925. p. 397.) — Piazza, Sulla etiologia della encefalite. (Ann. di Clin. med. Anno 11. fasc. 4.) — Prezzolini, Cappeli. Bologna 1920. — Proeschner, Berl. klin. Wochenschr. 1916. Nr. 17. — Queirolo, Rif. medica. 1920. aprile. — Ravant et Rabeau, Sur la virulence du l. c. r. des malades atteints d'herpes genitalis. (Compt. rend. Soc. de Biol. 17. 12. 1921.) — Römer und Joseph, Münch. med. Wochenschr. 1910. — Rosenow, Streptococci in relation to etiology of encephalitis epidemica: experimental results in 81 cases. (Journ. of Inf. Dis. 1924. Vol. 34. p. 329.) — Ders., A specific precipitin reaction in epidemic poliomyelitis. (Journ. Amer. med. Assoc. Vol. 84. 1925. p. 429.) — Rosenow, Town and Wheeler, Journ. Amer. med. Assoc. 21. Okt. 1916. — Sindoni e Misasi, Osservazioni e ricerche sulla etiologia della encefalite epidemica e della malattia di Heine-Medin. (XI Congresso di Pediatria. 1924. Mailand.) — Schnabel, Weitere Untersuchungen über die Aetiologie der Encephalitis epidemica. (Klin. Wochenschr. 1924. Nr. 23.) — Soffrè, Rif. med. 1920. p. 957. — Strümpell, Ueber primäre akute Encephalitis. (Arch. f. klin. Med. 1891.) — Santangelo e Zanelli, Ulteriori ricerche sull' encefalite letargica. (Rif. med. 1923. Nr. 2.) — Strauss, Hirschfeld and Loewe, Journ. of Inf. Dis. 1919. Nr. 5; 1920. Nr. 3. — Tarozzi, Sulla encefalite non suppurativa e la cosiddetta encefalite letargica. (Accad. di scienze lettere ed arti di Modena. 14. 6. 1921.) — Tessier, Gastinel et Reilly, L'inoculabilité de l'herpès. (Compt. rend. Soc. de Biol. 3. 2. 1923.) — Thalimber, Epid. (leth.) encephalitis. (Arch. neur. and psych. 1921. Vol. 5. p. 113.) — Uthoff, Ueber einige Fälle von doppelter Okul.-Lähmung. (Dtsch. med. Wochenschr. 1894.) — Veratti e Sala, Ricerche sperimentali sulla etiologia della encefalite epidemica. (Boll. Soc. med.-chir. di Pavia. 1922. fasc. 4.) — Dies., Sulla infezione erpetica sperimentale. (Ebenda. 1923. fasc. 4—6.) — Vegni, Contributo allo studio sperimentale dell' infezione erpetica. (Rif. med. 1922. Nr. 9.) — Ders., Ein experimenteller Beitrag zur Frage der Herpesinfektion. (Ztschr. f. exp. Med. 1924. Nr. 9.) — Völpino e Racchiusa, Influenza ed encefalite sperimentale. (Annali d'Igiene. 1922.) — Wiesner, Die Aetiologie der Encephalitis lethargica. (Wien. klin. Wochenschr. 1917. S. 932.) — Wickman, Kinderlähmung. Berlin 1911.

Nachdruck verboten.

Kapselsubstanz aus *Bacillus avisepticus*.

(Aus dem Bakteriologischen Institut der Kgl. ung. Petrus Pázmány-Universität der Wissenschaften (Direktor: Dr. Hugo v. Preisz, o. ö. Prof.).)

Von Dr. F. Hoffenreich in Budapest.

Kapselsubstanz rein darzustellen aus verschiedenen kapselbildenden Bakterien, ist mehreren Autoren schon gelungen. So gewannen Toeniessen aus Pneumobazillen, Kramár aus Anthrax, aus dem Bazillus des schleimigen Weines und aus *Bac. radicolica*, Heidelberger und Avery aus Pneumokokken reine Kapselsubstanz.

Aus Bazillen der Gruppe der Septicaemia haemorrhagica, von denen Preiß schon im Jahre 1897 festgestellt hat, daß sie eine Hülle oder Plasmarinde besitzen. Gózony hat ferner im Jahre 1913 mittels Tuscheverfahren die Kapsel demonstrieren können, wurde Kapselsubstanz aber

bisher noch nicht gewonnen. Deshalb schien es von Interesse, die Herstellung zu probieren.

Um größere Mengen von Bazillen zu gewinnen, wurde auf 50 Schalen mit je ca. 20 cm Durchmesser, mit pH 7,2 eingestellten Agarplatten gegossen und darauf der *Bac. avisepticus* ausgesät.

Die Agarkultur dieses Bakteriums besteht aus ein kleinwenig herabfließenden, durchscheinenden Kolonien. Die in Tusche untersuchten Bazillen sind von einer Kapsel umgeben, die ungefähr die doppelte Größe des Bazillenleibes besitzt. Hierbei sei bemerkt, daß sich niederfließende Kolonien nur auf dem mit Pferdefleisch bereiteten Agar gebildet haben, auf Agar, welcher für andere Zwecke aus vorher mit Hefe vergorener Bouillon bereitet worden war, haben wir solche Kolonien nicht bemerkt; auch war die Entwicklung der Bazillen viel spärlicher.

Die 24stünd. Kultur wurde pro Schale mit je 20 ccm dest. Wasser abgeschwemmt und, im ganzen das Verfahren von Laidlaw und Dudley befolgend, wurde die Darstellung der Kapselsubstanzen versucht.

Zur dichten Bazillensuspension wurde so viel KOH und Kaliumazetat zugesetzt, daß die Lösung 2 Proz. von diesen enthielt, und das Ganze wurde im Wasserbad 2 Std. lang erhitzt. Der Bazillenrückstand wurde durch die Zentrifuge ausgeschleudert und die oben schwimmende gelbbraunliche Flüssigkeit mit Essigsäure bis zur sauren Reaktion gegen Lackmus versetzt; zur Fällung der Eiweißkörper wurde $\frac{1}{3}$ Teil gesättigte Uranazetatlösung zugefügt. Nach Abfiltrierung des gebildeten Niederschlags resultierte eine gelbgefärbte, opaleszierende Lösung. Kalilauge wurde bis zur alkalischen Reaktion zugefügt, worauf sich eine Fällung bildete, welche aus Uranhydroxyd bestand, und in diesem Niederschlag fand sich auch die spezifische Substanz. Der durch Ausschleudern gewonnene Uranhydroxydniederschlag wurde in einen Mörser gelegt und so viel Essigsäure hinzugefügt, bis es gelöst war. Aus dieser Lösung schied sich nach Zugabe von Natriumphosphat Uranphosphat ab, das mit der Zentrifuge entfernt wurde. Die obenstehende, leicht gelblich gefärbte, durchsichtige Flüssigkeit gab mit Lugolscher Lösung braune Farbenreaktion, was die Anwesenheit von Glykogen zeigte.

I. Zur Gewinnung des Glykogens wurde die Lösung mit ebensoviele absolutem Alkohol zusammen gemischt. Es bildete sich eine starke Trübung, die sich nach 24 Std. als Niederschlag absetzte. Die obenstehende reine Flüssigkeit wurde abgehebert und der Niederschlag 2mal mit absolutem Alkohol und 1mal mit Aether gewaschen und nachher im Exsikkator getrocknet.

Die so erhaltene Substanz ist ein weißes, amorphes Pulver, das in Wasser leicht löslich ist. Mit Jod gibt es eine braune Farbenreaktion, die beim Erwärmen schwindet und beim Erkalten wieder zum Vorschein kommt. — Als Ausbeute wurden auf diese Art 0,28 g Glykogen gewonnen.

II. Die nach der Glykogenfällung abgeheberte Flüssigkeit wurde im Faust-Heimschen Apparat im warmen Luftstrom eingedampft, der Rückstand in wenig destilliertem Wasser aufgelöst, und zur Lösung wurde so viel absoluter Alkohol zugegeben, bis sich noch Fällung zeigte. Nach dem Absetzen wurde der Niederschlag zur Reinigung in Wasser noch einmal gelöst und durch Alkohol wieder gefällt, worauf es zuletzt mit Aether gewaschen und im Exsikkator getrocknet wurde.

Die Ausbeute betrug 0,342 g weißen Pulvers.

Die reine Kapselsubstanz quillt in wenig Wasser auf, und nach weiterer Wasserzugabe löst sie sich leicht auf. Die Eiweißreaktionen mit Sulfosalizylsäure, Millons Reagens und der Biuretkreaktion sind in 1proz. wässriger Lösung negativ. Auch die Reduktionsprobe verlief negativ. Nachdem die

Substanz mit 2,2proz. Salzsäure im Wasserbade 2 Std. lang gekocht worden war, reduzierte es Fehlings und Benedicts Reagens.

Nach Hagedorn und Jensen bestimmt, wurden durch Invertierung 46 Proz. des Ausgangsmaterials in reduzierende Substanzen übergeführt. Orzin- und Phlorogluzinreaktion waren mit der invertierten Substanz negativ. Nach Kjeldahl bestimmt, enthielt es 1,2 Proz. Nitrogen.

Die aus Pneumokokken von Heidelberger und Avery, aus Hefe von Müller und Tomcsik die aus den Bakterien der Coli- und lactis aërogenes-Gruppe von Tomcsik, die aus Tuberkelbazillen von Laidlaw und Dudley hergestellte Substanz, die zu den Polysacchariden gehörte, reagierte, mit Immunseren, dargestellt mit dem intakten Mikroorganismus, in der Präzipitinreaktion noch in sehr hoher Verdünnung spezifisch.

Um dies mit der so hergestellten Kapselsubstanz zu prüfen, wurde ein Kaninchen mit dem auf 56° abgetöteten Bac. avisepticus immunisiert, dessen Serum den Vollbazillus in Verdünnung von 1:640 agglutinierte. Die 1proz. Lösung der Substanz in physiologischer Kochsalzlösung präzipitierte mit dem Immunserum noch in Verdünnung von 1:640000 spezifisch.

Um die Antigennatur der hergestellten Kapselsubstanz zu prüfen, wurde die Immunisierung von Kaninchen versucht. In einer Reihe wurde 10proz. Lösung der Substanz in physiologischer Kochsalzlösung je 1 ccm dreimal in wöchentlichen Abständen Kaninchen intravenös eingeführt, und in einer anderen Reihe gaben wir die 10proz. Lösung der Kapselsubstanz in Schweineserum. Die Präzipitinreaktion mit der Substanz und dem Serum der so behandelten Kaninchen war noch in Verdünnung von 1:100 negativ, woraus ersichtlich ist, daß die so hergestellte Substanz auch zu den von Zinsser sogenannten „residue antigens“ gehört, die die Bildung von Antikörpern nicht auslösen können.

Zusammenfassung.

Aus Bac. avisepticus wurde eine Substanz isoliert, die sich polysaccharidartig erwies. Nach Invertierung reduzierte sie Fehlings und Benedicts Reagens und enthielt nur wenig Nitrogen. Mit Immunserum reagierte es in hoher Verdünnung spezifisch. Immunisierung von Kaninchen mit der Substanz war erfolglos.

Literatur.

Toenießen, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 85. — Kramár, Ebenda. Bd. 87. — Gózony, Ebenda. Bd. 68. — Heidelberger u. Avery, Journ. exp. Med. 1924. Nr. 8. — Mueller u. Tomcsik, Ebenda. 1924. Nr. 8. — Laidlaw u. Dudley, Brit. Journ. exp. Path. Vol. 6. — Tomcsik, Magy. Orv. Arch. 1927. Nr. 6. — Tomcsik, Proceed. Soc. for exp. Biol. Vol. 24. 1927.

Nachdruck verboten.

Untersuchungen über die Rolle des Bangschen Abortbazillus als menschenpathogenen Mikroben.

[Aus dem Statens Seruminstitut Kopenhagen (Direktor: Dr. Th. Madsen).]

Von **Martin Kristensen.**

Mit 6 Abbildungen im Text.

Im Jahre 1887 wurde von Bruce der Erreger des Maltafiebers entdeckt, der viele Jahre Micrococcus melitensis benannt wurde, jetzt aber am häufigsten den Namen Bacillus melitensis (oder nach amerikanischer

Nomenklatur *Brucella melitensis*) trägt, wegen seiner nahen Verwandtschaft mit dem *Bacillus* (*Brucella*) *abortus*, dessen Rolle als Ursache des ansteckenden Verkalbens der Rinder von den dänischen Forschern B. Bang und Stribolt 1896—97 festgestellt wurde. Daß die beiden Mikroben einander sehr nahe stehen, wurde zuerst 1918 von der amerikanischen Bakteriologin Alice Evans nachgewiesen, die später mit der Frage über die serologische Klassifikation der verschiedenen Stämme innerhalb der Gattung *Brucella* oder der „Abortus-Melitensis-Gruppe“ sich eingehend beschäftigt hat. Als Hauptresultat dieser Untersuchungen stellte sie 5 Typen auf: *Melitensis* A, *Melitensis* B, *Paramelitensis*, *Abortus* und *Paraabortus*, außer einzelnen anderen Stämmen.

Obwohl diese Einteilung auf einer rationellen Grundlage zu fußen scheint, hat sie doch bisher keine allgemeine Anerkennung gefunden und viele sind der Ansicht, daß durch die laboratorienmäßige Untersuchung verschiedene Typen innerhalb dieser Gruppe überhaupt nicht mit Sicherheit sich unterscheiden lassen. Gleichzeitig ist man jedoch einigermaßen darüber einig, daß in praktisch-epidemiologischer Beziehung 2 Infektionen von einander getrennt werden müssen, und zwar die *Melitensis*-Infektion, die hauptsächlich bei Ziegen, und die *Abortus*-Infektion, die vorzugsweise bei Kühen zu finden ist.

Es darf jetzt als sicher festgestellt angesehen werden, daß Menschen von einer Krankheit befallen werden können, die klinisch als Maltafieber (*Febris undulans*) anzusehen ist, durch Ansteckung nicht nur von Ziegen, sondern auch von Kühen. Auch im letzteren Falle gehört der pathogene Mikrobe zur *Abortus-Melitensis*-Gruppe und tritt bei Kühen in derselben Weise wie der gewöhnliche Abortbazillus auf. Es ist jedoch unzweifelhaft, daß Kühe, die an ansteckendem Verkalben leiden, bei weitem nicht dieselbe Ansteckungsgefahr für Menschen bedeuten, wie das bei *Bacillus melitensis* infizierten Ziegen der Fall ist.

Nach Ansicht einiger Forscher ist der eigentliche Abortbazillus Bang für Menschen völlig apathogen und in Fällen, wo Menschen durch Infektion seitens der Rinder angesteckt werden, soll dies darauf beruhen, daß die Kühe nicht mit dem *Bacillus* Bang, sondern mit dem von Bruce infiziert worden sind. Hingegen sind andere der Ansicht, daß auch der typische Bangsche Abortbazillus gelegentlich imstande ist, Menschen zu infizieren, welche Auffassung Verfasser für die wahrscheinlichste hält, wenn in Ländern, wo kein eigentliches Maltafieber vorkommt, Fälle beobachtet werden, wo die Ansteckung auf Rinder zurückgeführt werden kann, und wo aus den Patienten Mikroben isoliert werden können, die nach eingehender Untersuchung sich als mit dem typischen Abortbazillus identisch erweisen, gegenüber dem *Bacillus melitensis* aber Verschiedenheiten aufweisen.

Der 1. sicher konstatierte Fall von humaner Infektion mit dem *Bacillus* Bang wurde 1924 von Keefer aus Baltimore mitgeteilt. Später sind teils in den Vereinigten Staaten, teils in Rhodesia (siehe Ross) 20—30 Fälle mitgeteilt worden, wo die Diagnose (siehe die Uebersicht von Alice Evans, 1927) unter anderm dadurch verifiziert wurde, daß aus dem Blut der Patienten ein Mikrobe gezüchtet wurde, der bei sorgfältiger serologischer Untersuchung als *Bacillus abortus* Bang identifiziert werden konnte. Außer den Fällen, wo der *Bacillus* aus den Patienten gezüchtet wurde, wurde in Süd-Rhodesia eine Anzahl von Fällen mittels Seroreaktion gegenüber dem Abortbazillus diagnostiziert. 1 oder mehrere Fälle wurden in Deutschland von Steinert, Kreuter, Dietel und Veilchenblau, in England von Bamforth und in Frankreich von Giraud mitgeteilt, Fälle, deren Natur kaum zweifelhaft war, obwohl der *Bacillus* aus den Patienten nicht reingezüchtet worden ist.

Betreffs des klinischen Verlaufes dieser Abortbazilleninfektionen wird es genügen, zu bemerken, daß er vollständig in den Rahmen des klinischen Bildes des Maltafiebers (*Febris undulans*) fällt. Uebrigens kann auf die deutschen Forscher, insbesondere auf die orientierende Einleitung Kreuters, verwiesen werden.

Etwas außerhalb des übrigen Bildes des Auftretens dieser Infektion fällt die Mitteilung von Ficaï und Alessandrini über ein ausgesprochen epidemisches Fieber, welches unzweifelhaft von einer Ansteckung durch Rinder herrührt. Es scheint sich hier um eine besonders virulente Varietät der Abortus-Melitensis-Gruppe zu handeln, weil zugleich angeführt wird, daß der klinische Verlauf ernsthafter als beim gewöhnlichen Maltafieber war. Die aus anderen Ländern mitgeteilten Fälle scheinen im Gegensatz hierzu ziemlich sporadisch aufzutreten und von verhältnismäßig gutartigem Charakter zu sein.

Im ganzen erhält man aus der vorliegenden Literatur den Eindruck, daß die Infektion von Menschen mit dem Bazillus Bang so selten vorkommt, daß die Sache von nur sehr begrenztem praktischen Interesse sein kann.

Trotzdem fing ich am 1. 4. 1927 damit an, an sämtlichen, dem Statens Serum-institute für die Widal-Reaktion bei Typhus und Paratyphus zugesandten Blutproben die Agglutinationsprobe gegenüber dem Bazillus Bang vorzunehmen; es wurden somit von diesem Zeitpunkte an auf alle 3 Mikroben Untersuchungen angestellt. Der Zweck davon war, zu untersuchen, ob man in dieser Weise in irgendeinem seltenen Falle eine Infektion mit dem Bazillus Bang oder Bruce entdecken könnte. Das Patientenserum soll bei diesen beiden Infektionen eine Agglutination beider Bakterien hervorrufen, so daß man sie durch die gewöhnliche Serodiagnostik nicht unterscheiden kann; dies muß also in anderer Weise vor sich gehen.

Zur Herstellung der Kultur wurde ein Stamm verwendet, welcher mir von Herrn Untersuchungsvorsteher Axel Thomsen, der im veterinärmedizinischen Serumlaboratorium die serologische Diagnostik des ansteckenden Verkaltens des Rindes leitet, gütigst überlassen wurde. Die Kultur auf gewöhnlichem Agar wurde in Kochsalzlösung mit 0,2 Proz. Formalin aufgeschwemmt und diese Aufschwemmung wurde im Eisschranke aufgehoben. Sie war so dicht, daß man durch Gläser von 2 cm Diameter eben noch Druck lesen konnte. Von dieser Aufschwemmung wurden 0,4 ccm zu 0,1 ccm verdünntem Serum getan. Die Serumverdünnungen beziehen sich unten auf die Totalmischung von Serum und Kultur. In den ersten Wochen wurden die Sera in Verdünnungen von 1:25 bis 1:200 oder 1:500 ausstitriert; seit 27. 4. kamen aber konstant folgende Verdünnungen zur Verwendung: 1:50, 100, 200, 400, 800 und 1600. Die Ablesung wurde nach 12—20 stünd. Stehen¹ bei 50° in zugestöpselten Gläsern vorgenommen (im hiesigen Institut werden die Ablesungen in der letzten Zeit nach 5 Std. bei 37° ausgeführt, wo die Reaktion in der Regel abgeklungen ist; sicherheitshalber wurden die Gläser dann nachtsüber in den Gelatinethermostat (22°) gestellt, um danach wieder abgelesen zu werden). Für die Agglutinationsproben wurden ausschließlich unerwärmte Sera verwendet. In den größten Konzentrationen (1:25, 50, 100) wurde oft Agglutinationshemmung beobachtet, weshalb man die Reaktion nur dann als negativ bezeichnen darf, wenn wenigstens bis 1:200 hinab titriert wird und alle Röhrchen negativ sind.

Es stellte sich zu meiner Ueberraschung bald heraus, daß positive Reaktionen keineswegs selten waren. Im Zeitraume vom 1. 4.—15. 11. 1927 wurden zur Widal-Reaktion 1375 Proben von 1177 Patienten eingeliefert. Die Seren von 89 von diesen Patienten agglutinierten wenigstens in der Verdünnung 1:100 den Abortbazillus. Die Reaktion wurde in den meisten Fällen bei demselben

Patienten ein- oder mehrmals wiederholt. Die Patienten verteilen sich mit Bezug auf Reaktionsstärke (nach der stärksten Reaktion jedes einzelnen Patienten berechnet) folgendermaßen:

1:100	5
1:200	20
1:400	27
1:800	18
1:1600	17
	<hr/> 87

Stärkere Verdünnungen als 1:1600 wurden, wie erwähnt, nicht untersucht. — 2 Patienten, bei welchen die Agglutination nach einer anderen Skala vorgenommen wurde, sind in der Tabelle nicht angeführt.

Die Mehrzahl der agglutinierenden Seren und ein großer Teil der übrigen sind zugleich im Komplementbindungsversuche gegenüber dem Abortbazillus untersucht worden.

Im Gegensatz zu den Agglutinationsversuchen kamen für die Komplementbindungsversuche ausschließlich inaktivierte Sera ($\frac{1}{2}$ Std. bei 56°) zur Verwendung. Die positiv reagierenden Sera wurden in der Regel im Totalvolumen 0,4 ccm und in den Dosen $\frac{1}{50}$, $\frac{1}{100}$, $\frac{1}{200}$, $\frac{1}{400}$, $\frac{1}{800}$ und $\frac{1}{1600}$ ccm unter Verwendung von $1\frac{1}{3}$ Komplementeinheit und 2stünd. Bindung bei Zimmertemperatur untersucht. Von 277 Seren, die keine Agglutination gaben, reagierten im Komplementbindungsversuche nur 2, und zwar das 1 nur ziemlich schwach. Bei Seren, welche Agglutination zeigten, war auch immer das Komplement gebunden, obwohl die Reaktion in einzelnen Fällen doch nur ganz schwach war; in vielen Fällen war jedoch eine vollständige Hemmung der Hämolyse in sämtlichen 6 Dosen vorhanden.

Bei einem großen Teil der Patienten wurden Versuche gemacht, den *Bacillus abortus* aus dem Blute zu züchten. Einige Versuche, bei denen die Oberfläche von Aszitesagar mit einer geringen Blutmenge beimpft wurde, zeigten alle ein negatives Resultat. In einer Reihe von Fällen, wo größere Blutmengen in flüssigen Nährböden ausgesät wurden, war die Kultur mit weißen Staphylokokken, *Subtilis* u. a. verunreinigt. Bei einigen Patienten erfolgte der Züchtungsversuch zu einem Zeitpunkte, wo sie völlig afebril waren. Von allen diesen ungeeigneten Versuchen abgesehen, wurden während des Fiebers von 20 Patienten 2—5 ccm Blut in flüssige Nährböden eingesät: Glukose-Zitrat-Aszitesbouillon, Pferdeserumbouillon und besonders Leberbouillon (nach Huddleson); die letzte Nährflüssigkeit wies die besten Resultate auf.

Die Züchtung erfolgte bei 37° und nach der Angabe von Huddleson in einer Atmosphäre mit 10 Vol-Proz. CO_2 . Diese Methode ist bequemer, als die früher angewendete Züchtungsweise entweder in fast reinem Sauerstoff, oder bei 90 Proz. atmosphärischer Sauerstoffspannung, oder in hohen Schichten (Zonenwachstum etwas unterhalb der Oberfläche). Die Kohlensäure wird in dem Gefäße, in dem die Kulturen sich befinden, dadurch entwickelt, daß man den Inhalt eines Glases mit 2 ccm molekülnormaler Schwefelsäure pro Lit. Luftraum in eine größere Menge von NaHCO_3 , die mehrmals verwendbar ist, fließen läßt.

Falls zu einem früheren Zeitpunkte sich kein Wachstum einstellte, wurde der Züchtungsversuch 10—14 Tage lang fortgesetzt. In Zwischenräumen von einigen Tagen wurde Aszites- (oder Serum)agar beimpft und beim Eintreten von Wachstum wurden die Kulturen weiter untersucht.

Bei 13 der 20 Patienten wuchs der *Bacillus abortus* Bang; die Kulturen wurden in sämtlichen Fällen mittels folgender Merkmale verifiziert:

1) Sowohl makroskopisches als auch mikroskopisches Aussehen (Gram-Präparat) typisch, dem Aussehen von Kulturen aus Rindern völlig entsprechend; keine Beweglichkeit im feuchten Präparate. — 2) Bei gewöhnlicher aërober Züchtung (auf Aszitesagar) kein oder äußerst schwaches Wachstum, dagegen bei Züchtung in einer CO₂-Atmosphäre ausgiebiges Wachstum auf demselben Substrat. — 3) In 1 Woche keine Säurebildung in Glukosebouillon (Indikator: Bromthymolblau). — 4) In 1 Woche keine Indolbildung in einer Lösung von trypsinverdauten Kasein. — 5) In 17—21 Tagen keine Verflüssigung der Gelatine. — (In diesen Versuchen wurde die Züchtung natürlich in der erwähnten CO₂-Atmosphäre vorgenommen). — 6) Agglutination bis an die Titergrenze mit dem Serum eines mit demselben Rinderstamme („Nr. 1“), der für die Serodiagnostik zur Verwendung kam, immunisierten Kaninchens.

Ferner wurden mit aus 4 Patienten stammenden Kulturen und weiter mittels 5 Rinderstämmen (hierunter der soeben erwähnte) agglutinierende Kaninchenserum hergestellt.

Mit diesen 9 Seren und den entsprechenden Stämmen wurden „quadratische“ Agglutinations- und Agglutininabsorptionsversuche angestellt, d. h., daß sowohl die direkte Agglutination als auch die Absorption in sämtlichen 81 denkbaren Kombinationen von Serum und Stämmen vorgenommen wurde. Aus Platzrücksichten müssen die technischen Einzelheiten fortgelassen werden. Das Resultat der Untersuchung war, daß sämtliche 9 Kulturen bezüglich der antigenen Struktur als völlig identisch angesehen werden müssen. Die Stämme aus den übrigen 9 Patienten wurden, außer in dem einfachen Agglutinationsversuche, nur auf ihre Absorptionsfähigkeit gegenüber dem Serum „Nr. 1“ geprüft; sie waren alle imstande, dieses Serum zu erschöpfen.

Die aus 4 Patienten gezüchteten Stämme wurden von Professor O. Bang jede für sich 2 Meerschweinchen subkutan geimpft. Nach Injektion aller 4 Kulturen stellten sich typische Veränderungen ein, und zwar insbesondere starke Milzschwellung, in der Leber kleine zerstreute Nekrosen und zum Teil auch Drüsenschwellung, sowie bei einem Tiere Verdickung der Fußwurzel beider Vorderfüße. Die Kulturen aus 5 anderen Patienten wurden von mir an je 1 Meerschweinchen intraperitoneal geimpft. Hier wurde bei der Sektion hauptsächlich eine vergrößerte, etwas knotige Milz gefunden. Das Blut dieser 5 Tiere zeigte mit dem Abortbazillus starke Agglutination und Komplementbindung. Bei sämtlichen Tieren konnten aus Milz und zum Teil aus der Leber Bazillen von desselben makro- und mikroskopischen Aussehens wie der *Bacillus abortus* gezüchtet werden.

Prof. O. Bang hat mit 2 aus Patientenblute gezüchteten Stämmen je 1 ca. 6 Monate trächtige Kuh geimpft, deren Serum mit dem *Bacillus abortus* keine Reaktion gab, und die einem Bestande entstammte, bei welchem überhaupt kein Verkalben vorkam.

Die eine Kuh wurde am 16. 7. mit einer ganzen Schrägagarkultur intravenös geimpft; sie wurde heftig krank und das Verkalben erfolgte am 24. 7. Etwas blutige Flüssigkeit kam zum Vorschein, aber kein typisches Verkalbungsexsudat. Beim Mikroskopieren der Plazenta waren keine typischen Abortbazillen nachzuweisen, doch wurde der Bazillus aus dem Fötus gezüchtet und auch durch Impfung vom Plazentaexsudat an Meerschweinchen nachgewiesen. Meerschweinchen, die am 27. 7. und 7. 9. mit Milch dieser Kuh geimpft worden waren, zeigten typisch positives Resultat.

Da dieser Versuch nicht völlig überzeugend war, wurde am 4. 10. die 2. Kuh mit $\frac{1}{10}$ Schrägagarkultur (von einem anderen Patienten stammend) beimpft. Verkalben am 2. 11. Im Exsudat typische Abortbazillenhäufchen, im Fötus typische Veränderungen: starkes Oedem im Subcutis, Milz zerflüßlich,

Leber breiig; im Mageninhalt und in der Milz wurden Abortbazillen nachgewiesen.

Auf Grund der sämtlichen Untersuchungen kann als festgestellt angesehen werden, daß die aus den 13 Patienten gezüchteten Kulturen mit dem *Bacillus abortus* Bang identisch sind.

Bei 11 Patienten wurde der Harn auf dem *Bazillus* Bang untersucht, und zwar in den meisten Fällen sowohl durch Züchtung, als auch durch Meer-schweinchenversuche. In keinem Falle gelang es aber, den Abortbazillus nachzuweisen.

Vor der näheren Besprechung dieser Laboratoriumsuntersuchungen seien noch 5 Krankengeschichten als Beispiele für das Krankheitsbild referiert: Die Nummern sind dieselben, wie in „Ugeskrift for Læger. 1927. S. 1123, wo sämtliche 89 Fälle erwähnt sind. Aus Platzrücksichten führen wir in der Regel nur die beobachteten pathologischen Symptome an. Die Zahlen nach „Kplb.“ (Komplementbindungsversuche) geben den Hämolysegrad in den 6 Gläsern an (10 = totale Hämolyse). Wenn nichts anders angeführt ist, beziehen sich die mitgeteilten Agglutinations- und Komplementbindungsreaktionen immer auf den Abortbazillus.

Krankenberichte.

8. ♂ H. C. R., 27 Jahre alt, praktiz. Arzt auf Fünen. Die Krankheit fing am 22. 5. mit Uebelkeit, Kopfschmerzen und häufigen Erbrechen an. Temperatur jeden Abend gegen 39,5, morgens bedeutend niedriger (nahm Antipyretika ein). Mitunter Schüttelfrost, etwas Husten ohne Auswurf; Pat. war zum Teil außer Bett und hat seine Praxis ausgeübt.

Im Süden war er nie, auch nicht mit Ziegen in Berührung, hat dagegen oft rohe Kuhmilch genossen, so daß die Möglichkeit bestand, daß diese den *Bacillus abortus* enthalten haben kann. Er war am 15. 7. ins Krankenhaus Faaborg eingetreten und wurde am 14. 8. entlassen. Fieberverlauf und spezielle Therapie s. Fig. 1. Puls 72—88, verbreitete Milzdämpfung; am 22. 6. Milz zugleich palpabel. In den folgenden Tagen Abnahme der Milzschwellung. 8. 7.: 4100 Leukozyten.

Intravenöse Septakrolinjektionen von keiner sichtbaren Wirkung; nach intravenöser Neosalvarsaninjektion Diarrhoe; Befinden etwas schlechter. Nach subkutaner Injektion von Maltafieberserum Schwinden des Kopfschmerzes und der Uebelkeit. Anfangs August war das Befinden kaum so gut, als unmittelbar nach der Seruminjektion, doch aber bedeutend besser, als unmittelbar vor dieser; Appetit fortwährend gut. Nach 2 weiteren Seruminjektionen vom 4. 8.—7. 8. vollständiges Wohlbefinden.

Pat. war bei der Entlassung etwas müde und hatte in den Gliedern einige Schmerzen; im übrigen Wohlbefinden. Keine Milzschwellung. — 8 Tage nach der Entlassung universelles Urticaria-Exanthem. — 8. 9.: Etwas blaß und müde, im übrigen Wohlbefinden. — 11. 6.: Aggl. 1: 400, Kplb. 0.0.6.10.10.10. 16. 6.: Aggl. 1: 200, Kplb. 0.0.8.10.10.10. 6. 7.: Aggl. 1: 200; Wachstum vom *Bac. abortus* vom Blute aus. — Reaktion für Typhus und Paratyphus immer negativ (Fig. 1).

15. ♀ A. F. 29 Jahre alt. Sorö. Hat rohen Rahm auf Rhabarbergrütze genossen. Wurde etwa am 7. 5. etwas febril; 13. 5. leicht geschwellene Tonsillen mit einem grauen Belag, später, ohne objektive Veränderungen, einige Schluckbeschwerden. Temperatur s. Fig. 2; bis 26. 5. wurden verschiedene Antipyretica gegeben. Am 24. 5. und 25. 5. intramuskuläre Injektion von 2 cem Omnadin (wirkungslos). Am 8. 6. wird mitgeteilt, daß jetzt Milzschwellung vorhanden ist, die aber etwa am 1. 7. wieder verschwand. Uebrigens keine objektiven Symptome. Am 11. 11. war seit Mitte August afebril und arbeitsfähig.

28. 5.: Aggl. 1: 800. 11. 6.: Aggl. 1: 400, kein Wachstum aus Blut. 16. 7.: Aggl. 1: 400. 25. 8.: Aggl. 1: 200, Kplb. 0.0.2.8.10.10. 28. 9.: Aggl. 1: 200, Kplb. 0.4.10.10.10.10. — Reaktion auf Typhus und Paratyphus immer negativ (Fig. 2).

16. ♂ H. J. 39 Jahre alt, Bauernhofbesitzer in Ostseeland. Der Bestand war durch ansteckendes Verkalben stark infiziert. Blutproben von 6 Kühen wurden im Mai an das Serumlaboratorium der landwirtschaftlichen Hochschule gesandt. Sie reagierten positiv. Der Besitzer hütete selbst seine kranken Kühe und hatte auch ihre Milch getrunken. Im Februar hatte er und sein Hausstand eine mittelschwere Influenza durchgemacht; seitdem fühlte er sich nicht ganz gesund und wurde am 23. 4. hochfebril (Temp. s. Fig. 3). Objektive Symptome fehlten). Er erhielt 13 intravenöse Septakrolinjektionen (so viel ich weiß, ohne merkbare Wirkung; seit dem 26. 6. tägl. 0,5 g Sulphas chinicus. Auf dem Hofe keine ähnlichen andere Fälle.

9. 10. wurde gemeldet, daß Pat. am 4. 7. außer Bett kam, aber 14 Tage später wieder eine Woche febril war; seitdem afebril. „Fühlt sich jetzt gesund, aber etwas müde“.

7. 5.: Aggl. 1: 400. 16. 5.: Aggl. 1: 800. 22. 5.: Aggl. 1: 100, Kplb. 0.0.0.2.9.10.; kein Wachstum vom Blute aus. 22. 6.: Aggl. 1: 200, Kplb. 0.0.0.6.10.10. 9. 10. Aggl. 1: 50, Kplb. 0.0.2.9.10.10. Es war zugleich schwache Reaktion für Typhus, und zwar: 1: 25, 1: 25, 1: 25, 0 und 1: 50. Uebrigens keine spezielle Zeichen für Typhus (Fig. 3).

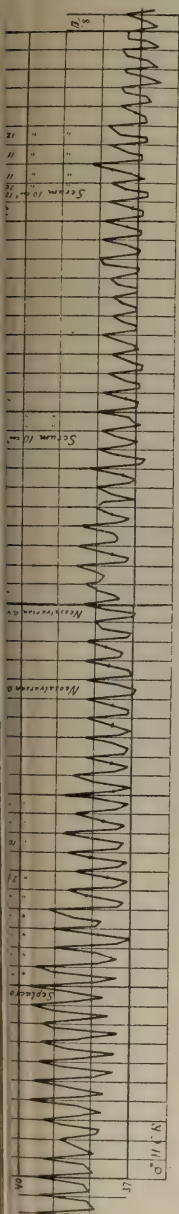


Fig. 1.

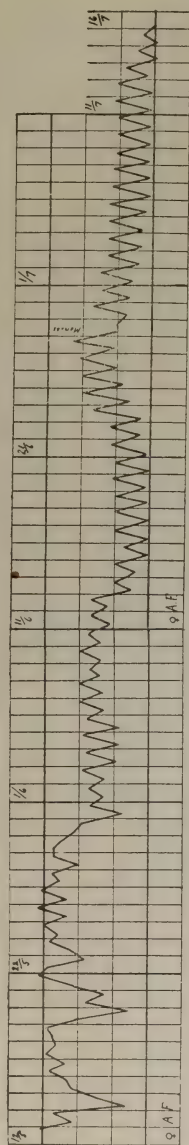


Fig. 2.

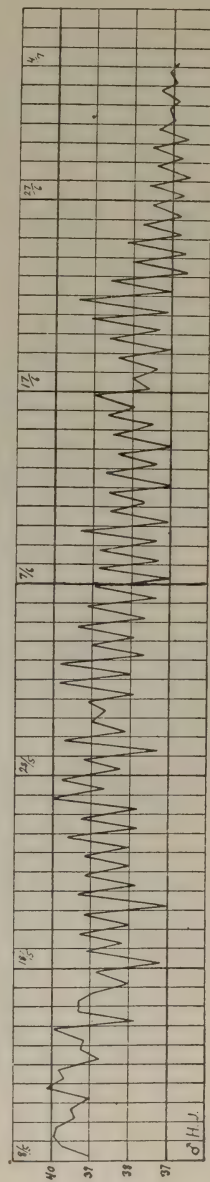


Fig. 3.

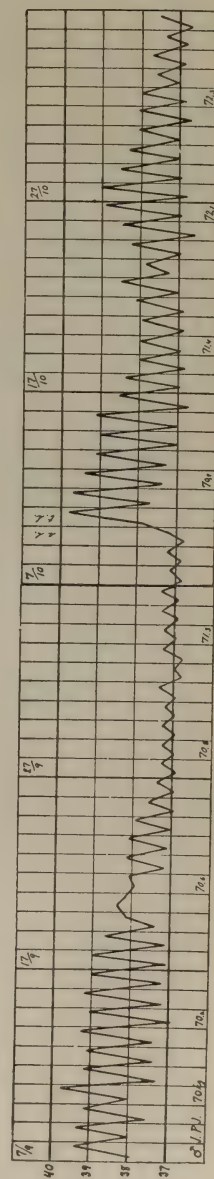


Fig. 4.

54. ♂ J. P. J. 32 Jahre alt. Hat sich 1921—23 in Algier aufgehalten und nach England, Schweden und Norwegen einige Seereisen gemacht. Seit dem Winter 1923 hat er jedes Jahr auf einem Hofe in Ostjütland gearbeitet, wo oft Verkalben vorkommt, und hat hier oft rohe Milch getrunken.

Im Anfang des Sommers Kopfschmerzen, Müdigkeit, leichte Fiebersymptome, besonders Nachtschweiß. Hat in kaum $\frac{1}{2}$ Jahr 10 kg an Gewicht verloren. — Wurde am 7. 9. ins Bezirkskrankenhaus zu Odder gebracht, nachdem die Temp. 14 Tage hindurch abends 39° betrug,

aber nur ein bisschen über 37° morgens. Temp. vom 7. 9. an s. Fig. 4. Röntgenbild: etwas vergrößerte Hilusdrüsen. — 12. 9.: Einiges Stechen in der linken Brustseite, aber ohne stetoskopische Veränderungen. 26. 9.: Etwas Husten. — Zweimal während des Aufenthaltes im Krankenhaus Erythem von multiformen Typus. — Am 9. 10. stand Pat. auf, nachdem die Temp. 12 Tage normal gewesen war; in unmittelbarem Anschluß stieg die Temp. als Einleitung einer typischen, undulierenden Fieberperiode wieder an (Fig. 4). — Trotz des Fiebers stieg das Gewicht des Pat. von 70 auf 72,3 kg. — 25. 10.: Aggl. 1:200, Kplb. 0.0.0.0.0. Reaktion für Typhus und Paratyphus negativ (Fig. 4).

70. ♀ M. H. N. 17 Jahre alt, hat in einem Hofe im mittleren Seeland gemolken und rohe Milch getrunken. Mitte Januar Fieber mit Gliederschmerzen. Im Bezirkskrankenhaus zu Roskilde vom 25. 1.—29. 5. behandelt (s. Fig. 5). 29. 1. Herpes labialis. 7. 2. Milz tastbar. Später wurde eine besondere strohgelbe Verfärbung der verdickten Haut der Vola und Planta beobachtet. Pat. ist im Verhältnis zu der andauernden hochfibrilen Periode sehr wenig mitgenommen. (7. 11.:) Seit der Entlassung völliges Wohlbefinden. — 11. 5.: Aggl. 1:400. Reaktion für Typhus und Paratyphus negativ (Fig. 5).

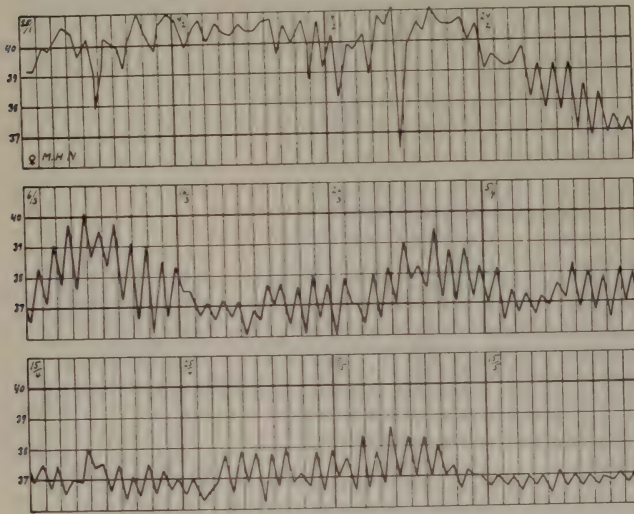


Fig. 5.

Mit wenigen Ausnahmen liegen auch betreffs der übrigen 89 Patienten genügende klinische Aufschlüsse vor, um einen Totaleindruck des betreffenden Krankheitsbildes sich bilden zu können. Der Raum erlaubt aber keine Darstellung sämtlicher Krankenberichte, weswegen ich weiter unten eine Gesamtübersicht über das Krankheitsbild gebe, doch soll zuerst diskutiert werden, ob die 89 Fälle tatsächlich alle Infektionen durch den Abortbazillus

Bangs sind, welche Fragen von folgenden Gesichtspunkten aus beleuchtet werden kann:

1. Ein Vergleich der klinischen Bilder a) der 13 Fälle, in welchen durch Züchtung des Abortbazillus aus dem Blute die Diagnose gesichert wird, und b) der 7 Fälle, wo es in einem einwandfreiem Züchtungsversuche sein Wachstum zu erhalten nicht gelang, und schließlich c) der übrigen 69 Fälle, in denen in keiner zweckentsprechenden Weise die Züchtung versucht worden ist.

Wenn das ganze vorliegende Material in der Weise geprüft wird, daß man innerhalb der 3 Gruppen die Krankheitsbilder teils unter einander, teils mit den auswärtigen Verichten über Maltafieber und Infektionen mit dem Bazillus Bang vergleicht, so wird man nichts dagegen sprechendes finden, daß die Fälle der Gruppen b) und c) ebensowohl wie die Fälle der Gruppe a) von dem Bazillus Bang hervorgerufen sein können. In keinem Falle konnte mit Sicherheit behauptet werden, daß eine andere Diagnose als wahrscheinlicher anzusehen sei. Von den 89 Patienten zeigten nur 4 gegenüber Typhus und Paratyphus die Widal-Reaktion und von diesen 2 sogar nur schwach (1:25 und 1:50). Nach den betreffs dieser Patienten vorliegenden Aufschlüsse darf es in diesen beiden Fällen als sehr unwahrscheinlich bezeichnet werden, daß ihre jetzige Krankheit Typhus oder Paratyphus sei; bei den übrigen 2 Fällen ist dieses

wenigstens zweifelhaft. Bei einigen Patienten wurden Faeces und Harn auf Bakterien der Typhus-Paratyphus-Dysenteriegruppe, in sämtlichen Fällen mit negativem Ausfalle, untersucht.

2. In bezug auf die Ansteckungsmöglichkeit, stellt sich heraus, daß auffällig viele Patienten es entweder mit Beständen zu tun gehabt hatten, die mit ansteckendem Verkälben stark infiziert waren, oder reichliche Mengen von roher Milch genossen hatten; auch diese Verhältnisse machen sich innerhalb aller 3 Gruppen geltend.

3. Weiter wurden verschiedene Untersuchungen über die Spezifität der Seroreaktion im Allgemeinen unternommen:

a) Komplementbindungsreaktion auf den Abortbazillus an 3239 Seren, die vom 1. 5.—4. 6. für die Wassermann-Reaktion eingeliefert worden waren. Von sämtlichen Seren zeigten nur 13 = 0,4 Proz. eine im ganzen ziemlich schwache, positive Reaktion. 10 von diesen 13 Seren wurden ausstitriert; die stärkste Reaktion war 0.0.3.8. Fig. 6 gibt eine graphische Darstellung der Verteilung sämtlicher Patienten (oben), und der 13 positiv reagierenden (die senkrechten Linien) unter den verschiedenen Altersstufen. Es wurden somit keine Zeichen irgend einer besonders großen Häufigkeit in einer bestimmten Altersklasse, z. B. bei Kindern, beobachtet. 6 der positiven Reaktionen wurden bei Männern, 7 bei Frauen, 4 bei Patienten mit positiver, 9 bei solchen mit negativer Wassermann-

Reaktion gefunden. Von den 3239 Blutproben zeigten 615 positive, 2624 negative

Wassermann-Reaktion (Fig. 6).

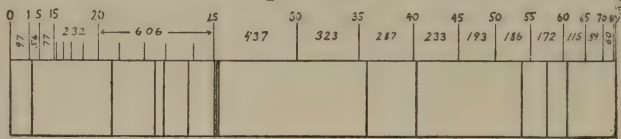


Fig. 6.

Selbst wenn alle 13 positive Reaktionen unspezifisch wären, würden solche falsche Reaktionen wegen ihres seltenen Vorkommens und ihrer geringen Stärke für die serologische Diagnostik keine bedeutende Fehlerquelle bedeuten. Mutmaßlich ist jedoch die Mehrzahl dieser Reaktionen nicht unspezifisch, sondern sie sind wohl durch eine vorhandene oder abgeklungene Abortbazilleninfektion verursacht. Diese Frage verdient jedoch, mittels fortgesetzter Untersuchungen, weiter verfolgt zu werden. Später sind wieder einige Wassermann-Sera untersucht und über 2 reagierende Patienten nähere Aufschlüsse gesucht worden. Der eine hatte 5 Monate früher auf einem Hofe gedient, der durch Verkälben infiziert war; der andere hatte vorher 4—5 Monate einem Tierarzt bei Kuhaborten assistiert. Von diesen beiden wurde nichts über darauffolgendes Fieber mitgeteilt. Wahrscheinlich haben sie eine leichte, unbeachtete Infektion gehabt. Schließlich sei hervorgehoben, daß von den 615 Seren mit positiver Wassermann-Reaktion nur 4 in Komplementbindungsversuche mit dem Abortbazillus reagierten. Es kann somit die Syphilis als keine Quelle unspezifischer Reaktionen gegenüber dieser Bakterie angesehen werden.

b) Dasselbe gilt für Typhus und Paratyphus. Denn von den 1177 Patienten gaben 46 gegenüber Typhus positive Widal-Reaktion, 90 reagierten mit Paratyphus B und 12 sowohl mit Typhus als auch Paratyphus positiv, ohne den Abortbazillus zu agglutinieren. Weder die Infektion mit den erwähnten Mikroben, noch der febrile Zustand als solcher geben somit gegenüber dem Abortbazillus Seroreaktion. In der Aufzählung der Patienten mit positiver Widal-Reaktion gegenüber Typhus und Paratyphus waren 4 Patienten, die sowohl mit *Bacillus abortus* als mit Typhus- und Paratyphusbazillen reagierten, nicht aufgenommen. Diese Fälle sind nämlich nicht als Mitagglutination des Abortbazillus als Folge eines Typhus oder Paratyphus anzusehen.

c) 39 Sera von Patienten am Rigshospitalet, Abteilung H., die fast alle an gonorrhoeischen Infektionen litten mit positiver Komplementbindung für Gonokokken, zeigten alle negative Komplementbindungsreaktion mit dem Bazillus Bang.

d) Dr. K. A. Jensen hat aus Jakobshavn auf Grönland, wo keine Viehzucht getrieben wird, Sera von 50 Personen mitgebracht, die auf Agglutination gegenüber dem Bazillus Bang in Verdünnungen von 1:50, 100 und 200, alle mit völlig negativem Erfolge geprüft wurden.

e) Einige Tiersera wurden auf Agglutination in Verdünnungen 1:10, 25, 100, 200 und 400 und auf Komplementbindung in den Dosen 0,04 und 0,02 untersucht: α . 35 Kaninchen, die bei Versuchen im hiesigen Institut mit Tuberkulose geimpft worden waren (darunter 6 sanokrysinbehandelte) zeigten mit beiden obigen Reaktionen negativen Ausfall. —

β . Dasselbe gilt für 19 gemischte Seren von 71 Meerschweinchen. — γ . Von 56 Pferden agglutinierten 13 den Bazillus Bang; die stärkste Reaktion war 1:50; sämtliche Sera zeigten aber völlig negative Komplementbindungsreaktion. Einige der Pferde waren gegen Tetanus, Diphtherie oder Scarlatina (Streptokokken) immunisiert worden; diese zeigten indessen keine größere Neigung zur Agglutinationsreaktion als die übrigen. — δ . Von 5 Ziegen, die gegen Typhus, beziehungsweise Paratyphus A und B, Dysenterie und Cholera immunisiert worden waren, reagierten die 4 ersten völlig negativ, während die 5. Agglutination bis 1:200 gab, aber nur bis 1:50 stark, und schwache Komplementbindung (0.1.8.10.). Auch ein 2. Choleraserum gab mit dem Abortbazillus eine schwache Reaktion, so daß man somit bei Cholera unspezifische Reaktionen erwarten kann, die aber wahrscheinlich nur schwach ausfallen werden.

Aus amerikanischen Untersuchungen geht hervor, daß Tularämie eine ziemlich starke Mitagglutination gegenüber der Melitensis-Gruppe gibt, und es kann keineswegs als ausgeschlossen angesehen werden, daß dies auch bei anderen Infektionen der Fall sein kann. Im ganzen muß man jedoch, wenn man die oben erwähnten Versuche mit den vorliegenden großen, praktischen Erfahrungen über ansteckendes Verkalben der Rinder zusammenfaßt, die Sero-reaktion gegenüber dem Bacillus abortus Bang als sehr spezifisch ansehen, und zwar wohl in eben so hohem Grade wie die Reaktion auf Typhus und Paratyphus. Die einzige wesentliche Fehlerquelle ist sicher die, daß die Reaktion noch ziemlich lange nach der Heilung erfolgt, so daß eine Reaktion während einer febrilen Krankheit gelegentlich von einer früheren Abortbazilleninfektion herrühren kann, welche überdies so leicht gewesen sein konnte, daß sie anamnestisch sich nicht finden läßt.

Diese Fehlerquelle spielt hier jedoch kaum eine größere Rolle, als bei Typhus und Paratyphus, wo auch Jahre hindurch ein Rest der Reaktion bestehen kann. Es gilt hier wie dort, daß je stärker die Reaktion ist, um so geringer die Wahrscheinlichkeit ist, daß sie einer früheren Krankheit entstammt.

Einen anderen Anhaltspunkt für die Beurteilung, ob die Reaktion auf den Bacillus abortus neu oder alt ist, kann man vielleicht durch einen Vergleich der Stärken der Agglutinations- und Komplementbindungsreaktionen gewinnen. Es scheint nämlich eine Hauptregel zu sein, daß die letztere Reaktion sich später als die erstere einstellt und länger als diese besteht. Deshalb wird man bei einer verhältnismäßig frischen Infektion öfters eine starke Agglutination und eine schwache Komplementbindung finden, während bei älteren Infektionen das Umgekehrte der Fall ist.

Die beiden Reaktionen ergänzen sich gut. Wie früher erwähnt, habe ich auf die Reaktionen kein Gewicht gelegt, bei denen die Agglutination 1:50 betrug, oder wo in den stärkeren Verdünnungen eine weniger typische Aggluti-

nation bei negativer Komplementbindung sich zeigte. Insgesamt wurde bei 12 Patienten eine derartige „zweifelhafte“ Reaktion beobachtet. Nur über 4 von diesen Patienten wurden nähere Auskünfte gesucht. Bei 2 von diesen 4 zeigte sich die Reaktion bei wiederholter Untersuchung inkonstant; die klinischen und anamnestischen Aufschlüsse ergaben ein etwas unklares Bild; der 3., welcher 1:50 agglutinierte, starb an tuberkulöser Meningitis; beim 4. gab ein stark blutiggefärbtes Serum bis 1:1600 eine etwas lockere Agglutination, aber keine Komplementbindung; eine neue Probe zeigte keine Agglutination. Patient starb nach kurzer Zeit an Cancer ventriculi.

Es scheint also, daß die Grenze zwischen den zweifelhaften und den bedeutenden Reaktionen in zweckmäßiger Weise gezogen ist.

Nachdem wir jetzt in unserem Vertrauen über die Zuverlässigkeit der Serodiagnostik bestärkt worden sind, können wir damit rechnen, daß höchstens einige wenige der 89 Fälle von keiner Infektion mit dem *Bacillus abortus* (oder anderen zur *Abortus-Melitensis*-Gruppe gehörenden Bakterien) herühren.

Auf Grund sowohl der Seroreaktion als auch des klinischen Bildes wäre es möglich, daß einige der Fälle von dem *Bacillus melitensis* herrührten; dies ist indessen unwahrscheinlich, weil keiner der Patienten in den letzten Monaten vor ihrer Krankheit sich in Gegenden aufgehalten hatten, wo Maltafieber herrscht. Die Mehrzahl der Patienten war überhaupt nie im Auslande gewesen. Nur wenige waren mit Ziegen in Berührung gekommen, und es ist nichts über das Vorkommen der *Melitensis*-Bazillen bei unseren hiesigen Ziegen bekannt.

Wir wollen jetzt das allgemeine klinische Bild des *Febris undulans* (*Bacillus abortus* Bang) zeichnen. (Die nach den verschiedenen Symptomen angeführten Zahlen geben an, in wie vielen Fällen das betreffende Symptom beobachtet wurde. Da die Aufschlüsse über viele der Patienten nicht erschöpfend sind, sind die meisten der angeführten Zahlen sicher zu klein; dies gilt annehmlich besonders für die Puls- und Rachensymptome.)

Nach einer Temperatursteigerung, die sich über mehrere Tage erstreckt, hält sich das Fieber ein paar Wochen oder länger als eine oft etwas unregelmäßige Continua; danach fällt es lytisch und hält sich in einigen Fällen normal, aber sehr oft steigt die Temperatur, wenn sie eben normal geworden ist, oder etwas früher, wieder allmählich an, und setzt sich mit einer oder öfters mit mehreren Wellen von 1—4 wöchentlicher Dauer fort (39); sie werden allmählich niedriger, und nach 2—4 Monaten wird die Temperatur wieder normal. In einigen Fällen sind diese Wellen von völlig afebrilen, 1—2 Wochen oder noch länger dauernden Perioden voneinander getrennt. Für das Fieber charakteristisch sind außer den wellenförmigen Verlauf in der Regel beträchtliche Tagesschwankungen¹⁾ und damit folgende subjektive Symptome.

Das Allgemeinbefinden ist gewöhnlich auffallend gut, und die Patienten werden durch das andauernde Fieber nur wenig geschwächt. Die Patienten sind oft kongestioniert und schwitzen stark; der Puls ist oft verhältnismäßig langsam (17); Milzschwellung (15) (und vielleicht universelle Drüsenschwellung) sind oft vorhanden, Roseolae aber nie. Die Krankheit scheint oft mit einer katarrhalischen Angina anzufangen (8); in einigen Fällen wird während des Verlaufes der Krankheit ein vesikulöser Ausbruch in der Mundhöhle beobachtet (3). Nicht selten sind Bronchitis (10) und Diarrhöe (7). In einigen Fällen findet man Neigung zu Nasen- und Darmblutungen (9), und in 1 Falle auch Blutungen

1) Diese sind sicher oft etwas größer, als aus der Temperaturkurve hervorzugehen scheint, denn wenn die Temperatur nur an 2 festen Zeitpunkten des Tages gemessen wird, wird man ja in der Regel nicht eben Maximum und Minimum treffen.

der Mundschleimhaut und der Nieren. Oft stellen sich verschieden lokalisierte Schmerzen ein (21), die vielleicht mit dem Neur- und Arthralgien bei Maltafieber verglichen werden können.

Bei einigen der Patienten wurde im Harn Albumen nachgewiesen; es scheint sich aber nur um eine gewöhnliche febrile Albuminurie zu handeln. In der Regel ist Leukopenie mit relativer Lymphozytose vorhanden. Es gibt Fälle, die über $\frac{1}{2}$ —1 Jahr oder noch länger sich erstrecken können, was wahrscheinlich als Ausdruck einer geringen Reaktionsfähigkeit anzusehen ist, weil das Fieber verhältnismäßig niedrig und die Antikörperbildung gering ist. (In den Handbüchern wird angegeben, daß bei Maltafieber ein Zusammenhang zwischen niedrigem Agglutinationstiter und andauerndem Verlauf vorhanden ist).

Nur in 2 von den 89 Fällen war der Verlauf letal. In 1 Falle handelte es sich um ein Aufflackern einer chronischen Endokarditis. Ob die Endokarditis des Patienten von Anfang an vom Bazillus Bang hervorgerufen worden war, oder ob die Infektion mit diesen Mikroben nur als eine Komplikation anzusehen ist, muß dahingestellt bleiben. (Es wurde übrigens bei 4 oder 5 von den übrigen Patienten Zeichen auf ein leichteres Leiden des Myo- oder Endokardium beobachtet.)

Im anderen Falle handelte es sich um ein typisch undulierendes Fieber von 6monatiger Dauer.

Mit vollem Recht wird sowohl die Infektion mit dem Bazillus Bruce (Maltafieber) als auch die mit dem Bazillus Bang unter den Namen Febris undulans zusammengefaßt. In klinischer Beziehung verhält sich die Infektion mit dem Bazillus Bang, und zwar auch bezüglich der vielen verschiedenen Variationen des Fieverlaufes, nämlich ganz wie ein gutartiges Maltafieber.

Ein besonderer Punkt, der in der ausländischen Literatur Gegenstand einiger Diskussion gewesen ist, ist die Frage betreffs der eventuellen Rolle des Abortbazillus als Ursache der Fehlgeburt bei Frauen. In dieser Beziehung sind von dem gegenwärtigen Material keine Aufschlüsse erhältlich, da, soviel mir bekannt ist, keine der weiblichen Patienten gravid war. Es ist kaum wahrscheinlich, daß der Bazillus Bang in dieser Beziehung irgendeine größere Rolle spielt. Aus dem Auslande liegt nichts sicheres hierüber vor, und es wird angegeben, daß Maltafieber keine größere Neigung zum Hervorrufen von Fehlgeburt aufweist.

Die Diagnosen, welche man bei verkannten Fällen von Abortbazilleninfektion am ehesten zu stellen geneigt sein wird, sind: Typhus oder Paratyphus, Influenza, generalisierte oder „okkulte“ Tuberkulose, Sepsis und Malaria.

In bezug auf Geschlecht und wahrscheinliche Infektionsquellen verteilen sich die 89 Patienten folgendermaßen:

a) Personen, welche mit infizierten Rindern direkt zu tun gehabt haben.	♂ 33	♀ 1	'	34
b) Infektion durch Milch oder Rahm ¹⁾	26	13	'	39
c) Unsichere Infektionsquellen.	9	7	'	16
	68	21	'	89

Es läßt sich nicht entscheiden, in welcher Ausdehnung die Personen der 1. Gruppe a) durch Genießen der Milch ihrer Kühe infiziert worden sind. Auffallenderweise befindet sich kein Tierarzt unter den 89 Patienten.

Daß Männer öfters als Frauen angesteckt werden, läßt sich zumteil dadurch erklären, daß Männer viel mehr als Frauen mit den Rindern in direkte Berührung kommen.

¹⁾ Die Bazillen sammeln sich größtenteils im Rahme (Huddleson).

Ob Männer größere Mengen roher Milch als Frauen trinken, kann ich nicht entscheiden. Falls dies nicht der Fall ist, sollte man annehmen, daß die ersteren bei gleicher Infektionsgefahr empfindlicher als Frauen sind, denn in der Abteilung „b“ befinden sich doppelt so viele Männer als Frauen.

Es ist jetzt die Frage, ob während der Ausführung dieser Untersuchungen bei Menschen eine besondere epidemische Abortbazilleninfektion vorhanden war? Die ist indessen zu verneinen, denn die Fälle traten in allen Gegenden des Landes zerstreut auf; unter den 89 Fällen war in demselben Hausstande nie mehr als 1 Fall vorhanden. Innerhalb bestimmter Perioden des Zeitraumes vom 1. 4.—1. 7. war auch keine systematische Anhäufung aufgetreten. Die Menscheninfektionen durch den Bazillus Bang scheinen somit Unfälle zu sein, die in ausgesprochen zufälliger Weise ohne gegenseitigen Zusammenhang auftreten. In unseren hiesigen Fällen hatten wir keine Anhaltspunkte für die Annahme einer besonderen menschenvirulenten Varietät des Abortbazillus als Ursache dieser Infektionen, im Gegensatz zu anderen völlig apathogenen Varietäten.

Die rein praktische Bedeutung des Aufstellens der Diagnose dieser Krankheit liegt 1. darin, daß man den Patienten und seinen Verwandten mit der guten Prognose beruhigen, sie aber gleichzeitig auf die Möglichkeit eines lang dauernden Verlaufes mit mehreren Fieberwellen vorbereiten kann, und weiter darin, daß der Patient von den Vorschriften (Isolation, strenge Diät) verschont bleibt, die der Typhusdiagnose folgen, und von der oft ziemlich energischen Therapie chemo- oder serotherapeutischer Art, welche bei Sepsis oder Tuberkulose eventuell angezeigt ist. Das Hauptmittel der Behandlung ist wahrscheinlich Bettruhe (1—2 Wochen nach dem Aufhören des Fiebers) und eine Kost, die genügend nahrhaft ist, um Gewichtsverluste zu verhindern, zugleich aber leicht verdaulich. Von Septakrol, Omnadin und Milchinjektionen hat man kaum eine Wirkung gesehen. Maltafieberserum (aus dem Serum Institute zu Milano) scheint mitunter wirksam zu sein; es ist aber unmöglich, zu entscheiden, ob diese Wirkung von den spezifischen Antikörpern herrührt. Im hiesigen Institute wird gegenwärtig ein Pferd mit den von Patienten entstammenden Kulturen immunisiert. Vielleicht wird dieses Serum bessere Resultate als das Maltafieberserum geben. Größere Aussicht auf eine Abkürzung der Krankheit wird man wahrscheinlich durch eine Vakzinbehandlung haben, eine Therapie, die auch bei Maltafieber am häufigsten verwendet wird. Vermutlich ist für einen hochfebrilen Patienten ein heterologes Vakzin (Typhus, Staphylokokkus) am rationellsten, während bei subfebrilen, andauernden Fällen eine spezifische vielleicht zweckentsprechender ist. Da die Abortbazillenstämme anscheinend außerordentlich gleichartig sind, die spezifische Wirkung zugleich eine zweifelhafte ist, liegt für die Herstellung eines Autovakzins kein Grund vor; eine aus einer Mischung von mehreren Stämmen hergestellte dürfte wohl ebenso nützlich sein.

Es ist in prophylaktischer Beziehung von Bedeutung, nach Berührung infizierter Rinder, besonders während und nach dem Verkaben, die Hände gründlich zu reinigen, und den Foetus sowie den Ausfluß als infektiöses Material zu behandeln. Die Gefahr der Ansteckung von Mensch zu Mensch darf als sehr gering angesehen werden, so daß es nicht notwendig ist, außer gewöhnlicher Reinlichkeit besondere Desinfektions- oder Isolierungsvorschriften zu machen. Aus infizierten Kühen stammende Milch darf nur in gekochtem oder pasteurisiertem Zustande genossen werden. Dagegen ist es zweifelhaft, ob eine hinlängliche Grundlage vorhanden ist, im allgemeinen vom Genusse roher Milch abzuraten, denn im Verhältnis zu der Anzahl von Menschen, die rohe Milch oder Rahm genießen, sind die befallenen doch nur an Zahl gering. Was besonders die Kindermilch betrifft, scheint die Gefahr, soweit man vorläufig urteilen kann, keine große zu sein. Von den 89 Patienten war kein einziger unter 13 Jahre alt,

trotzdem Widal-Proben von 126 Kindern von 0—12 Jahren untersucht worden sind, von welchen 34 Typhus- oder Paratyphusreaktion zeigten. Später sind jedoch auch einige Fälle unter Kindern von 8—12 Jahren festgestellt worden. Auch bezüglich des Maltafiebers wird angegeben, daß Kinder seltener als Erwachsene befallen werden. Um die Frage bezüglich der Kindermilch weiter zu beleuchten, wurden die Chefs mehrerer größerer Kinderkrankenhäuser befragt, ob bei Kindern, die rohe Milch bekommen hatten, Fieberfälle beobachtet worden waren, die von einer Abortbazilleninfektion herrühren könnten; sie glaubten indessen alle, keine Zeichen für etwas derartiges gesehen zu haben.

Da der Abortbazillus bei dem hier zu Lande verwendeten Pasteurisierungsverfahren mit voller Sicherheit zugrunde geht (Abtötungstemperatur 55—60°), sind Milch und Milchprodukte nach dem Pasteurisieren völlig ungefährlich. Besonders ist hervorzuheben, daß in Dänemark alle Exportbutter aus pasteurisiertem Rahm hergestellt wird, und deswegen eine Infektion mit dem Bangschen Bazillus durch diese Butter ausgeschlossen ist.

Die Mitteilung könnte vielleicht den Eindruck machen, daß die Infektion mit dem Bazillus Bang bei Menschen in Dänemark weiter verbreitet ist, als in anderen Ländern, wo in gleicher Ausdehnung Viehzucht getrieben wird, und wo die ansteckende Verkalbung mit derselben Häufigkeit vorkommt. Für eine solche Annahme liegt aber kein Grund vor.

Vor diesen Untersuchungen wußte man überhaupt noch nicht, ob diese Infektion hier zu finden sei, und dies wäre wohl noch der Fall, wenn sie nicht durch bakteriologische Untersuchungen entdeckt worden wäre.

Untersuchungen über die Verbreitung dieser Infektion sind am besten in den Ländern vorzunehmen, wo das eigentliche Maltafieber nicht vorkommt, weil sie sonst (z. B. in Italien und Südfrankreich) durch die mit einer Unterscheidung der Melitensis- und Abortus-Infektionen verknüpften Schwierigkeiten in sehr hohem Grade kompliziert werden. Man kann unter diesen Verhältnissen nicht ohne weiteres die Behauptung ablehnen, daß die sogen. Abortbazilleninfektionen tatsächlich Melitensis-Infektionen sind. Diese Erklärung würde indessen, wie schon erwähnt, in einem Lande, wie Dänemark sehr unwahrscheinlich sein, und dasselbe wird wohl auch z. B. für Deutschland und England zutreffen. Im voraus ist anzunehmen, daß in diesen und anderen Ländern bei Menschen eine ähnliche Verbreitung der Infektion mit dem Bazillus Bang wie in Dänemark gefunden wird, sobald die Frage durch systematisch-serologische Untersuchungen aufgenommen wird.

Außer einer großen Anzahl von Kollegen, die mir bei dieser Untersuchung behilflich waren, muß ich Herrn Prof. Oluf Bang (Landwirtschaftliche Hochschule in Kopenhagen) und Herrn Untersuchungsvorsteher Axel Thomsen (am Serumlaboratorium ebenda) für ihren Rat und ihre Hilfe, hauptsächlich bei den Tierversuchen und der serologischen Diagnostik, meinen besonderen Dank ausdrücken.

Literatur.

- Bamforth, Lancet. Vol. 1. 1927. p. 818. — Bang u. Stribolt, Ztschr. f. Tiermed. Bd. 1. 1897. S. 241. — Dietel, Münch. med. Wochenschr. 1927. S. 1704. — Alice C. Evans, Hyg. Laborat. Bullet. 1925. p. 143; Journ. Amer. Med. Ass. Vol. 88. 1927. p. 630. — Ficaï u. Alessandrini, Annal. d'Ig. 1925. p. 1. — Giraud, P., Presse méd. 1926. p. 1609. — Huddleson, Hadley u. Torrey, Journ. Infect. Dis. Vol. 40. 1927. p. 352. — Keefer, John Hopkins Hosp. Bull. Vol. 35. 1924. p. 6. — Kreuter, Klin. Wochenschr. 1927. S. 1380. — Ross, Journ. of Hyg. Vol. 26. 1927. p. 403. — Steinert, Münch. tierärztl. Wochenschr. 1926. S. 73. — Veilchenblau, Münch. med. Wochenschr. 1927. S. 1705.

Nachdruck verboten.

Ueber die Morphologie, Uebertragungsversuche und klinische Bedeutung der beim sporadischen Abortus des Rindes vorkommenden Trichomonaden.

(Aus dem veterinär-pathologischen Institut der Universität Zürich (Direktor Prof. Dr. W. Frei).)

Von Dr. **L. Riedmüller**, Oberassistent des Instituts.

Mit 4 Abbildungen im Text.⁹

Nachdem das seuchenhafte Verkälben von Bang und Stribolt (1896) ätiologisch erfaßt war, häufte sich auch über den sporadischen Rinderabortus die Literatur in weitgehendstem Maße. Es soll jedoch auf die verschiedenen Erreger, die zu diesem in ursächliche Beziehung gebracht wurden, nicht näher eingegangen werden. In der neueren Literatur finden wir die vereinzelte Beobachtung aufgezeichnet, wonach in Rinderföten ein Protozoon aufgefunden wurde. Es handelt sich dabei um einen den Flagellaten, und zwar der Gattung *Trichomonas* zugehörigen Mikroorganismus.

Drescher erwähnt gelegentlich der 3. Jahrestagung der Fachtierärzte in München 1925 erstmals einen solchen Fall aus der veterinär-polizeilichen Anstalt Schleißheim, wo durch Hopfengärtner im Magen eines 7 Monate alten Foetus *Trichomonas* in Reinkultur nachgewiesen wurde. — Pfenninger beschreibt 2 weitere Fälle aus dem Jahre 1926. Der 1. betrifft einen spontanen Abortus nach 30 Wochen Trächtigkeit mit Ret. secund., welchem folgende Vorgeschichte beigegeben ist: Dem Tierarzt, der 10 Std. nach dem Verwerfen die manuelle Entfernung der Nachgeburt einleitete, fiel die stark faulige Beschaffenheit und ödematös-sulzige Schwellung der Plazenta auf, so daß er vermutete, die Fäulnisprozesse könnten schon während der Trächtigkeit eingesetzt haben. Pathologisch-anatomisch stellte Verf. am Fötus im Wesentlichen fest: Hautrötung, stark vermehrtes, rötliches Transsudat von klarer Beschaffenheit in Bauch-, Brust- und Herzbeutelhöhlen, Leber etwas vergrößert. Rötung der Labmagen- und Dünndarmschleimhaut mit frischen Blutpunkten, Labmageninhalte hellgelb, trüb, flüssig. Eihaut stark in Fäulnis übergegangen, ödematös, Kotyledonen mit fibrinösen Auflagerungen und kleinen hämorrhagischen Bezirken.

Es gelang ihm, die Trichomonaden in Labmagen-, Dünn- und Dickdarminhalt, sowie im Peritoneal- und Pleuratrassudat und in der Perikardflüssigkeit nachzuweisen. Daneben fand er gramnegative, koliforme Stäbchen und grampositive Kokken. Auf die kurze Beschreibung der Morphologie und der Bewegung des von ihm gefundenen Flagellaten soll später eingegangen werden. Uebertragungsversuche auf Kaninchen, Meerschweinchen und Mäuse auf subkutanem Wege gelangen nicht. Ebenso konnte durch Impfung trächtiger Meerschweinchen Abortus nicht ausgelöst werden. Die Untersuchung der geimpften Meerschweinchen auf Abortus Bang war serologisch, pathologisch-anatomisch und kulturell negativ. Eine Blutprobe der Kuh ergab allerdings mit Abortus Bang einen Agglutinationstiter von 1:640, was Verfasser in Anbetracht des negativ verlaufenen Kultur- und Tierversuchs auf vorausgegangene Infektion oder Impfung mit Reinkultur zurückführte.

Der zweite Fall betrifft den Labmagen eines 5 Monate alten Fötus aus einer Gegend in der Abortusfälle häufiger vorkommen sollen, Abortus Bang jedoch nie gefunden wurde.

Mazzanti beschrieb 1900 ein Geißelinfusorium aus Scheide und Uterus von Jungrindern. Im Uterus einer geschlachteten Ferse fand er ca. einen halben Liter sauer reagierender Flüssigkeit, die das Aussehen sauer gewordener Milch zeigte und in welcher er birnförmige oder ovale, 15–20 μ lange Infusorien erblickte. In diesem, wie in zwei weiteren Fällen, handelte es sich um Rinder, die permanent unfruchtbar blieben, so daß er die gefundenen Infusorien mit der Sterilität und Abortus in ursächlichen Zusammenhang brachte.

Neuerdings wurden auch am tierhygienischen Institut in München im Scheidenschleim des Rindes Trichomonaden nachgewiesen (persönliche Mitteilung von Herrn Prof. Ernst).

Während ich weitere Angaben über das Vorkommen von Trichomonaden in Föten, sowie in Scheide und Uterus von Rindern und den übrigen Haustieren vermißte, fand ich

in der gynäkologischen Literatur der Humanmedizin eine Anzahl Arbeiten, aus denen hervorgeht, daß die von Donné 1837 entdeckte *Trichomonas vaginalis* als ein häufig vorkommender Scheidenbewohner bekannt ist, seine pathogene Bedeutung jedoch von verschiedenen Seiten in Frage gestellt wird, die auf experimentellem Wege ihrer Lösung noch nicht näher gebracht werden konnte.

Die ersten Angaben über die *Trichomonas vaginalis* stammen von Donné, Kölliker und Scanzoni sowie Haußmann. 1870 wies letzterer bei 200 Untersuchungen schwangerer Frauen 75mal (37 Proz.), bei 100 kranken nicht schwangeren Frauen in 40 Proz. der Fälle die Protozoen nach, während er sie bei gesunden fast nie fand. Bei virulenten Katarrhen der Geschlechtsorgane sah er sie in großer Menge auftreten und betrachtete daher ihre Anwesenheit lediglich als Begleiterscheinung entzündlicher Prozesse. In den meisten Lehrbüchern und einschlägigen Werken findet man infolgedessen auch *Trichomonas vaginalis* als Saprophyten bezeichnet (Dofflein, Neumann und Mayer, Rodenwaldt und von Prowazek, Bensen u. a.) — Zufällig gefunden wurde *Trichomonas vaginalis* in der Harnblase gravider Frauen von Baatz und Arnold, sowie von Escomel in der Blase einer Diabetikerin in Peru. Miura, Marchand, Dock und neuerdings Katsunuma beschreiben ihr Vorkommen bei männlichen Personen. Während Miura keine Krankheitserscheinungen beobachtete, bestand im Fall Dock Harndrang, schmerzhaftes Urinieren und Hämaturie. Katsunuma sah den Flagellaten sogar im Urin eines 3jährigen Knaben, der an Darmkatarrh litt.

Erstmals hat Hoehne 1916 die *Trichomonas vaginalis* in ätiologische Beziehung zu einer bei Frauen häufig beobachteten eitrigen Kolpitis gebracht. In 206 Untersuchungen fand er bei nicht graviden Frauen 28 Proz., bei graviden 34 Proz. infiziert. Das in großer Menge vorhandene Vaginalsekret hatte in den meisten Fällen typischen Charakter. Menge des Vaginalsekrets, Leukozytengehalt und Reizerscheinungen gingen mit der Trichomonadenzahl parallel und erreichten ihre größte Höhe intra graviditatem. Mit gelungener Bekämpfung der Trichomonaden soll in wenigen Tagen normales Sekret zu finden sein, auch wenn die Bakterienflora qualitativ unverändert blieb. Gleichzeitig schwand der Juckreiz. Mit dem Neuaufreten von Trichomonaden steigerten sich jedoch die eitrigen und entzündlichen Reizerscheinungen wiederum, was ihm die pathogene Bedeutung der *Trichomonas vaginalis* für bestimmte eitrig Kolpitiden nahelegte.

Traugott bestätigte Hoehnes Befunde, indem er den Erreger bei 125 Schwangeren mit eitrigem Scheidenkatarrh in 21,6 Proz. Fällen nachweisen konnte, während er sie bei 36 nicht schwangeren Frauen mit Polypen, Zervixrissen oder Erkrankungen, die zu Änderungen der bakteriologischen und chemischen Zusammensetzung des Scheidensekrets führen, in 50 Proz. der Fälle finden konnte. Übertragung auf Meerschweinchen, Reinzüchtung und Färbung gelang nicht.

Ponoschina (1923) fand in 77 Untersuchungen bei 22 Kindern nie Trichomonaden, dagegen waren von 29 Frauen, die an Fluor litten, 16 mit *Trichomonas* infiziert.

Schmid und Kamnicker (1925) stellten bei Frauen in 69,9 Proz. der Fälle von Fluorsekret *Trichomonas vaginalis* fest, und zwar bei saurer, als auch bei alkalischer Reaktion. Fast stets befanden sich die Flagellaten in Symbiose mit Bakterien, vor allem dem *Micrococcus gazogenes alcalescens*, auf den der Gasgehalt des Trichomonadensekrets zurückgeführt wird.

Ogleich die Kolpitis granularis infectiosa ein häufiges Leiden der Rinder darstellt und viel darüber gearbeitet wurde, finde ich neben Mazzantis Angaben keinerlei Veröffentlichungen, die auf ähnliche Zusammenhänge hinweisen, wie sie Hoehne für die Trichomonadenkolpitis der Frau gegeben hat. Meine Beobachtungen jedoch, die sich auf ein Material von 105 zur Untersuchung auf die Abortusursache angefallenen Föten und Labmägen von Föten des Rindes erstrecken, bestärken mich in der Annahme, daß Trichomonaden auch beim Rinde häufiger gefunden werden können, als es nach der vorliegenden Literatur den Anschein hat, konnte ich sie doch in diesen 105 Untersuchungen nicht weniger als 9mal beobachten. Ich erkläre mir die spärlichen Angaben zum Teil damit, daß man bis jetzt bei gelegentlichen bakteriologischen Untersuchungen über die normale und pathologische Scheidenflora des Rindes versäumt hat, Nativpräparate zu betrachten, denn in den gefärbten Ausstrichen sind die Erreger dem Ungeübten nicht erkenntlich, worauf ich später noch zurückkomme.

Im folgenden möchte ich zunächst über die von mir beobachteten 9 Fälle kurz berichten.

Kasuistik.

Fall I: 15. 10. 26. Magen eines 5 Monate alten Fötus. Untersuchungsantrag: Ab. Bang?
Befund: Magen äußerlich o. B. Inhalt dünnflüssig, gelbliche Gerinnsel.
Mikroskopisch: zahlreiche Trichomonaden.

Kulturen: anaërob und aërob steril.

Tierversuch: 2 Meerschweinchen subkutan mit 0,5 ccm Labmageninhalt geimpft: negativ.

Fall II: 17. 10. 26. Fötus ca. 14—17 Wochen alt. U. A.: Ab. Bang?

Befund: Fötus graugelb, stark mazeriert, wenig rötlichdünnflüssiger Labmageninhalt.

Mikroskopisch: gefärbtes und ungefärbtes Präparat o. B.

Kulturen: saprophytische Bakterienarten, kein Abortus Bang.

Eihautstück schmutzig, gelbgrau, Kotyledonen graugelb.

Mikroskopisch: neben zahlreichen akzidentellen Keimen Trichomonaden in großer Anzahl.

Fall III: 1. 7. 27. Fötus ca. 13—14 Wochen alt. U. A.: Ab. Bang? Anamnese: Muttertier zeigte rötlichen Ausfluß, im letzten halben Jahr hatten 2 Tiere abortiert.

Befund: Fötus mit Amnion und Plazenta. Im Amnion trübe, milchige Flüssigkeit. Fötus weißgrau, Organe stark mazeriert, Leber breiig, Mageninhalt käsig.

Mikroskopisch: Nativpräparat zahlreiche Trichomonaden, starke Mischinfektion.

Kulturen: Ab. Bang negativ.

Fall IV. 19. 7. 27. Fötus ca. 5 Monate alt. U. A.: Ab. Bang?

Befund: Fötus frisch aussehend und gut erhalten. Beginnende Behaarung an Maul und Augenlidern. Haut blaßrötlich, mit starker Injektion der Hautgefäße. Oedeme fehlen. In Brust- und Bauchhöhle große Mengen rötlich-wässrigen Transsudats. Magendarmtraktus äußerlich o. B. Schleimhaut ramifiziert gerötet, gelblich, flockiger Inhalt. Leber breiig und mit fleckigen Rötungen an der Oberfläche, stellenweise gelblichbraun. Fleckige Blutungen unter der Nierenkapsel. Peritoneum stark injiziert mit punktförmigen Hämorrhagien. Milz leicht geschwollen, fleckige, subkapsuläre Blutungen und Injektion der Kapsel. Lunge mit fleckigen, subpleuralen Blutungen, vereinzelte lobuläre Blutungen, insbesondere an den scharfen Rändern. Verwaschene, fleckige, subepikardiale Blutungen längs der Koronargefäße und am Aortenaustritt.

Mikroskopisch: Brust- und Bauchhöhlentranssudat massenhaft Trichomonas, desgleichen im Labmagen und Darmtraktus, spärlicher in Herzbeutel und Lunge. Labmagen: Ab. Bang negativ.

Kulturen: negativ.

Tierversuch: 3 trächtige Meerschweinchen geimpft, eines vaginal, zwei intraperitoneal. Kein Abortus, jedoch auch keine Jungen. (Möglicherweise der Beobachtung entgangen?). 1 Meerschweinchen gestorben am 2. 9. 27 Kokzidiosis. Scheide und Gebärmutter: keine Trichomonaden.

Fall V. 19. 7. 27. U. A.: Ab. Bang? Anamnese: Seit 2 Jahren periodische Abortusfälle im Bestande.

Befund: Labmagen äußerlich o. B. Leichte Rötung der Schleimhaut, gelbbraunlicher, flüssiger Inhalt.

Mikroskopisch: zahlreiche lebende Trichomonaden.

Kulturen: vereinzelte, große Kolonien, plumpe, gramnegative Stäbchen.

Tierversuch: 1 Meerschweinchen intraperitoneal mit 1 ccm Labmageninhalt geimpft. Getötet am 8. 9. 27. Ab. Bang positiv.

Agglutination der eingesandten Blutprobe des Muttertieres vom 1. 8. gleichfalls Ab. Bang positiv.

Kotuntersuchung des Muttertieres: Keine Trichomonaden, normaler Kot.

Fall VI. 2. 8. 27. Fötus ca. 14—17 Wochen alt.

Befund: Fötus mit Eihäuten versehen. Kotyledonen ohne Nekrose. Schmutzig-braune Allantoisflüssigkeit. Amnion umspannt eng den Fötus und zeigt sich stellenweise mit dem Fötus verwachsen. Wenige Tropfen Amnionflüssigkeit. Fötus bereits mumifiziert und trocken.

Mikroskopisch: Im ungefärbten Präparat vereinzelte noch schwach bewegliche und zahlreiche tote Trichomonaden in Allantois und Amnion. Ab. Bang negativ.

Kulturen: Starkes Wachstum 2—4 mm großer Kolonien, gramnegative, coliähnliche Stäbchen. Endo große, jedoch nicht rötende Kolonien, Malachit kein Wachstum.

Tierversuch: 1 Meerschweinchen geimpft am 2. 8. Agglutination und Sektion negativ.

Fall 7. 19. 8. 27. Fötus ca. 5 Monate alt. U. A. Ab. Bang?

Befund: Fötus grauweiß, leicht mazeriert, Bauchhöhle eröffnet, an den Augenbogen einzelne Haare. Muskulatur rötlich, ödematös durchtränkt. In Bauch-, Brusthöhle und Perikard seröse, rötliche Flüssigkeit. Darm leicht gerötet, Magendarminhalt rötlichgelb, breiig, sonst o. B.

Mikroskopisch: Nativpräparat aus Labmagen einzelne feine, bewegliche Stäbchen, aus Pleuratrassudat zahlreiche Trichomonaden und einzelne, kurze, dicke Stäbchen.

Kulturen: aus Pleuratrassudat, Labmageninhalt und Herzblut weiße, runde Kolonien, gramnegative ovoid Stäbchen, grampositive Diplostreptokokken.

Tierversuch: 1 Meerschweinchen intraperitoneal mit 1 ccm Pleuratrassudat, Labmageninhalt und Herzblut geimpft am 17. 8. Agglutination und Sektion: Ab. Bang negativ.

Fall VIII. 30. 8. 27. Fötus ca. 7 Monate alt.

Befund: Haut rot verfärbt. An Maul, Augenlidern, Ohren und Beinen beginnende Behaarung, in den Körperhöhlen gelb-seröses Transsudat. Magendarmtraktus äußerlich o. B. Im Labmagen gelbschleimiger Inhalt mit gelben Flocken durchsetzt.

Mikroskopisch: aus Labmageninhalt Trichomonas und kokkenähnliche Gebilde.

Kulturen: negativ.

Tierversuch: 1 Meerschweinchen intraperitoneal mit 0,5 ccm Labmageninhalt. Ab. Bang negativ.

Fall IX. 22. 10. 27. Fötus ca. 5½ Monate alt. U. A. Ab. Bang? Anamnese: Bestand von 2 Tieren, die abortierende Kuh wurde vor einem Monat zugekauft, trächtig seit 4. Mai.

Befund: Fötus schmutzig-dunkelrot verfärbt, leicht ödematöse Beschaffenheit der Subkutis. Muskulatur dunkelrot, in Bauch- und Brusthöhle rötlich-wässriges Transsudat. Magen- und Darmserosa schmutzigrot. Schaummilz. (Fötus anscheinend längere Zeit abgestanden).

Mikroskopisch: Aus Labmagen lebende Trichomonaden. Ab. Bang negativ.

Kulturen: Ab. Bang negativ, Diplokokken.

Tierversuch: 1 Meerschweinchen intraperitoneal mit 0,5 ccm Labmageninhalt geimpft. † 22. 10. 27. Sektion: Peritonitis. Mischinfektion von Diplokokken und Trichomonaden.

Aus dieser Kasuistik sind verschiedene Einzelheiten hervorzuheben. In den 9 Fällen, die 2 Labmägen und 7 ganze Föten betreffen, konnten angetroffen werden:

1. Trichomonas in Reinkultur 2mal.
2. Trichomonas in Mischinfektion mit Abortus Bang 1mal.
3. Trichomonas in Mischinfektion mit gramnegativen Stäbchen, Diplokokken, Streptokokken oder verschiedenen Saprophyten 6mal.

Sämtliche Fälle datieren aus der Zeit vom Juli bis Oktober. Die Trächtigkeitsdauer, die ich teilweise mangelnder Angaben halber nach der Länge der Föten bestimmte, betrug bei den verschiedenen Gruppen:

1. Trichomonas in Reinkultur: 20 und 28 Wochen.
2. Trichomonas + Abortus Bang: Altersbestimmung unmöglich.
3. Mischinfektionen:

1 × 13	bis 14 Wochen
2 × 14	„ 17 „
1 × 20	„ „
1 × 22	„ „
1 × 28	„ „

Nach diesen Erhebungen wurden Trichomonaden nur in fortgeschrittenen Fällen der Trächtigkeit, und zwar von der 13. bis 28. Woche ermittelt. Diese Zusammenstellung könnte jedoch zu Trugschlüssen führen, da kleinere Föten nur selten zur Untersuchung kommen, nachdem Abortusfälle im Frühstadium vom Tierbesitzer nicht immer beobachtet, oder vom Tierarzt nicht eingesandt werden. Bestimmte Schlüsse lassen sich bei der geringen Anzahl ohnehin nicht daraus ziehen.

Pathologische Anatomie.

Die pathologisch-anatomischen Veränderungen an den Föten zeigen oft schon deshalb nichts Charakteristisches, weil die bei den häufigen Mischinfektionen mit akzidentellen Erregern vorkommenden Fäulnisprozesse das Bild wesentlich trüben. Trotzdem kann auch hier der Verdacht leicht erweckt werden, wenn Trichomonaden in sehr großer Menge auftreten, denn stets zeigen dann die Körperflüssigkeiten, die schon von Mazzanti im Uterusexsudat festgestellte milchige Trübung, welche hier und da auch einen gelblichweißen Ton annehmen kann und dann an Gelbgaltnmilch erinnert. An dem im frischen Zustand zur Untersuchung zugesandten Kadaver fiel die starke Rötung und Injektion der äußeren Haut auf. Die Subkutis zeigte sich mehr oder weniger

ödematös durchtränkt, ähnlich, wenn auch nicht so stark, wie man es bei Abortusbanginfektionen beobachten kann. Stets fand man in Bauch- und Brusthöhle, sowie im Herzbeutel rötliches oder gelbseröses Transsudat, im Labmagen gelblichflockigen, rötlichgelben oder gelbschleimigen Inhalt. Ausgesprochene, subseröse Blutungen wurden nur einmal beobachtet.

In bezug auf die Trichomonadenbefunde in den einzelnen Körperhöhlen möchte ich vor allem auf den Fall IV hinweisen, wo im noch frischen Kadaver die Erreger in Bauch- und Brusthöhlentranssudat und im Magendarmtraktus in großer Menge, in der Herzbeutelflüssigkeit und Lunge etwas spärlicher gefunden wurden.

Es erscheint mir diese Feststellung deshalb wesentlich, weil in dem einen oder anderen Fall die Möglichkeit einer akzidentellen Invasion mit Trichomonaden nicht von der Hand zu weisen ist. Die Beobachtung, daß solche Flagellaten auch im Freien vorkommen können, hat man bereits gemacht. (Prowazek). Künstler fand sie in „brackigen Gewässern“ und Kuczynski sah sie im Sommer 1912 lebhaft beweglich in einer Pfütze, welcher Kuh- und Schafjauche zufloß. Leider hat er dieselben nicht näher beschrieben. Ich habe versucht, die von mir beschriebene Art in dünnbreiigem Kuhmist bei Zimmertemperatur anzusiedeln, was mir allerdings nicht gelang. Die in großer Zahl verimpften Flagellaten hatten nach 48 Std. ihre Beweglichkeit vollständig eingebüßt.

Auch Pfenninger hat sich mit der Frage der Herkunft des Erregers beschäftigt und als Beweis dafür, daß er nicht erst sekundär eingewandert sein kann, sein Vorkommen in Reinkultur im Magendarmkanal und den Körperhöhlentranssudaten des von ihm beschriebenen Fötus angeführt. Insofern konnten mich die Befunde Mazzantis aus Scheide und Uterus der von ihm untersuchten Fersen bestärken in der von Pfenninger und auch von mir vertretenen Annahme einer intra graviditatem erfolgten Invasion.

Morphologie.

Da ich eine eingehendere Beschreibung der in Rinderföten vorkommenden Trichomonaden nicht gefunden habe, möchte ich mich damit näher befassen.

Bewegung.

Ein Tropfen des Transsudats aus Föten im Dunkelfeld betrachtet, läßt zunächst nur längsovale, in lebhaft schlängelnder Bewegung bunt durcheinander wimmelnde Lebewesen erkennen. Einzelheiten kann man infolgedessen anfangs nicht erfassen. Erst wenn die Bewegungen langsamer werden, gelingt es, Zellen von rüben-, flammen-, spindel- und eiform oder mehr rundlicher Gestalt zu erkennen. An ihrem vorderen Ende gewahrt man 3 Geißeln peitschenartige Bewegungen ausführen. Indem sie nach vorne ausholen und dann nach dem Körper schlagen, scheinen sie eine gegen sich in der Längsachse gerichtete Strömung zu verursachen, denn man kann beobachten, wie Zelldetritus oder Bakterien immer wieder gegen die Vorderseite der Trichomonaden gezogen werden und nur mühsam davon loskommen. Seitwärts sieht man die undulierende Membran in lebhafter, wellenförmiger Bewegung von vorne nach rückwärts ziehen und in eine kurze, freie Geißel endigen. Die Stellung dieser Membran wechselt oftmals, was auf Rotation in der Längsachse zurückgeführt werden muß. Anfangs schwimmen sie mehr in gerader Richtung kreuz und quer und erinnern etwa an das Bild, das man bei Betrachtung eines Schwarms kleiner Fische zu sehen bekommt. Die einzelnen Individuen sind imstande, mechanischen Kräften von außen in den verschiedensten Richtungen nachzugeben. Sobald ihre Vitalität jedoch durch äußere Einflüsse geschwächt wird, verlieren sie diese

Fähigkeit, der Körper wird starrer, die Bewegungen der Geißeln und der undulierenden Membran langsamer und man sieht sie nur noch in einer Richtung kreisförmig sich bewegen oder zuletzt auf der Stelle um die eigene Achse sich drehen. Es hat den Anschein, als ob sie einer Enzystierung entgegen gehen würden. Nicht selten sieht man rübenförmige Individuen sich auffallend in der Längsrichtung strecken und gegen das Ende zu abschnüren, so daß hier ein kugelförmiges Gebilde nur mehr lose haftet und gelegentlich abgeschleudert wird (Exkretvakuolen). In gefärbten Präparaten konnte ich derartige freiliegende

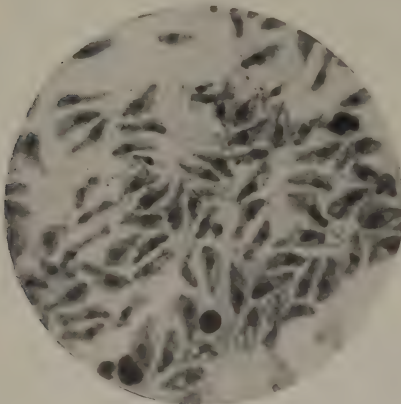


Fig. 1.



Fig. 2.



Fig. 3.



Fig. 4.

Erklärung der Mikrophotogramme.

Fig. 1. Uebersichtsbild. Neben den zahlreichen Trichomonaden Diplokokken und Leukozyten.

Fig. 2. Zusammengeballte Trichomonaden in Reinkultur, starke Vergrößerung.

Fig. 3. Stellt die oben beschriebenen morphologischen Einzelheiten der Trichomonaden in starker Vergrößerung dar.

Fig. 4. Scheint eine Zystenform zu sein.

Vakuolen oftmals nachweisen. Vereinzelt kann man Formen beobachten, die gegenüber den andern durch plumpere Gestalt und abnorme Bewegung auffallen und die Teilungsformen darstellen.

Färbung.

Ich habe schon darauf hingewiesen, daß vielleicht die Schwierigkeit der färberischen Darstellung auch die Ursache ist, warum wir über das Vorkommen von Trichomonaden bis heute so wenig erfuhren. In Methylenblau-, Karbolthionin- und Gram-Präparaten kann sie der Uneingeweihte nicht erkennen. Er wird lediglich Zellfragmente in ihnen sehen. Wer daher nicht gewohnt ist, im Dunkelfeld zu beobachten, dem werden solche Befunde stets entgehen. Aber auch mit Spezialfärbungen wird man von vielen Präparaten nur wenige für zytologische Studien brauchbare finden, eine Tatsache, die von allen Morphologen hervorgehoben wird. Selbst in ein und demselben Präparate konnte ich neben den best gelungensten Exemplaren vollständig unbrauchbare Individuen finden. Die Möglichkeit, alle Einzelheiten genau zu erfassen, ist daher gering und oftmals können interessant erscheinende Formen nicht beschrieben werden, weil ungünstige Lage der Geißeln, gewaltsame Formveränderungen infolge mangelhafter Fixierung, oder ungleichmäßige Färbung Fehlerquellen einschließen. Nur an einem großen Material können daher brauchbare Erhebungen gemacht werden. Es sei andererseits gesagt, daß gerade die Körperhöhlentranssudate der Föten zu solchen Studien sehr gut geeignet sind, da Trichomonaden wohl selten in so großer Zahl und Reinkultur und ohne fremde Beimengungen angetroffen werden dürften (siehe Mikrophotogramme S. 108).

Bei der Herstellung meiner Präparate habe ich mich der Romanowsky-Giemsa-Färbung bedient. Es wurde dabei folgendermaßen vorgegangen: 1) Feuchte Fixierung mit Hilfe des Schaudinnsschen Sublimatalkohols, in welchem ich die Präparate nach unten schwimmend ca. 12 Std. beließ. 2) Wasserspülung, 3) Jodalkohollösung (3 cem Lugol zu 100 cem Alkohol, 70proz.), 4) Wasserspülung, 5) 0,5proz. wässrige Natriumthiosulfatlösung 10 Min., 6) gründliche Wasserspülung, 7) Färbung mit Azur-Eosinlösung („Ciba“) 1½ Tropfen auf 1 cem Aqua dest. ca. 12—24 Std. (in den ersten Stunden der Färbung wurde die Lösung einmal gewechselt), 8) Wasserspülung, 9) Azeton-Xylolreihe, und zwar a) Azeton 95 cem + Xylol 5 cem, b) Azeton 70 cem + Xylol 30 cem, c) Azeton 30 cem + Xylol 70 cem, d) Xylol pur.

Die Differenzierung ist mehr oder weniger Gefühlssache. Es empfiehlt sich daher, immer eine große Anzahl von Deckglasausstrichen anzulegen, damit im jeweiligen Falle die günstigsten Bedingungen eruiert werden können.

Größenmessungen.

Größenmessungen nahm ich sowohl an ungefärbten, als auch an gefärbten Präparaten vor. Die Resultate stimmten in gut gelungenen Färbungen mit denen der Nativpräparate ziemlich überein und ergaben Längen von 10—25 μ und Breiten von 5—10 μ . Bei dem großen Formenreichtum, den man hier antrifft, wechselt das Verhältnis von Breite zur Länge erheblich. Die runden Formen messen meist 10—10 μ , die ovalen 5—15, 5—20, 7—20, 8—18, 10—25 μ usw.

Bewegungsapparat.

Am stumpfen Vorderende der Individuen sehen wir 3 freie Geißeln, die gewöhnlich aus einer geringen Einkerbung gerade oder geschlängelt nach vorn verlaufen. Die Länge der Geißeln ist im Vergleich zur Körperlänge ziemlich konstant. Gemessen wurden in gefärbten Präparaten stets nur Exemplare mit gestreckten Geißeln. Die durchschnittliche Länge beträgt ca. 15 μ . Auch solche Individuen, deren Körperlänge nur 10 μ betrug, wiesen Geißellängen von 14—15 μ auf. Von über 15 μ großen Exemplaren war das Verhältnis von Körper- zur Geißellänge etwa 15:16, 16:14, 17:15, 20:15, 21:20 μ usw. Die drei Geißeln gehen aus einem gemeinsamen, granulierten Körper, dem Basalkörper oder Blepharoplasten, hervor, der im Giemsa-Präparat dunkelviolett erscheint und seinen Sitz im obersten Ende des Achsenstabs hat. Bei

vielen Exemplaren konnte ich 3 Granula nebeneinander oder zusammengeballt deutlich unterscheiden. Dicht daneben gewahrt man ein zweites, kleines Basalkorn, dem der Randfaden mit der undulierenden Membran entspringt. Diese verlaufen in 4—6 Windungen um den Körper und dehnen sich am hinteren Ende in eine freie Geißel aus. Der losgelöste Randfaden mißt in gestrecktem Zustande etwa das 3fache der Körperlänge.

Der Basalfaden.

Eng verbunden mit dem Basalkorn der undulierenden Membran scheint mir ein 2. Basalkorn zu sein, aus dem der Basalfaden derselben seinen Ursprung nimmt. Er verläuft mehr oder weniger gebogen, um an der Stelle des Austritts der hinteren Geißel zu enden.

Der Achsenstab.

Er stellt m. E. ein röhrenförmiges Gebilde dar, welches im Giemsa-Präparat von hellrot erscheinenden, scharf konturierten Linien begrenzt wird. Am Vorderende ist er keulenförmig oder noch besser gesagt, magenähnlich erweitert. Er zieht allmählich sich verjüngend, so daß beide Linien noch in der oberen Hälfte parallel verlaufen, nach dem Hinterende. Hier umspannt ihn ein gleichfalls hellrot erscheinender Gürtel, der gewöhnlich an den beiden Außenseiten des Achsenstabs nur als dunkler gefärbte Körnchen in Erscheinung tritt, in vielen Fällen jedoch bei leichtem Drehen der Mikrometerschraube als deutlicher Ring zu erkennen ist. Nach dieser Begrenzung tritt der Achsenstab aus der Zelle und endet unmittelbar in eine kurze Spitze. Nur wo Formveränderungen oder Bildung von Exkretvakuolen stattfinden, dehnt sich das Protoplasma über diese aus. Die Form des Achsenstabs ist gleichfalls weitgehenden Schwankungen unterworfen. In gestreckten Exemplaren sieht man ihn gerade durch die Mitte verlaufen, zuweilen leicht gekrümmt, während er in runden Formen stark gebogen und zuweilen peripher gelagert erscheint, oder in s-förmiger Krümmung durch die Mitte zieht. Vereinzelt beobachtet man spiralförmige Drehungen.

Der Kern.

Der Kern stellt ein ovales, manchmal spindelförmiges Gebilde dar, das durch Einlagerung einer wechselnden Anzahl (ca. 10—15) ungleichgroßer, dunkelvioletter, chromatischer Körperchen auffallend in Erscheinung tritt. Die Größe des Kerns ist ca. 5—7 μ , die Breite 2—3 μ . Er liegt in der vorderen Hälfte der Zelle dem Achsenstab an der Verjüngungsstelle eng an. Manchmal umschließt er diesen teilweise. Nie konnte ich ihn frei in der Zelle finden.

Ein Zytostom kann nur in einigen, günstig liegenden Exemplaren neben dem Blepharoplasten eingepflanzt gesehen werden. Es verläuft sackartig längs des Achsenstabs bis in die Höhe des Kerns. — In der Zelle sieht man verschieden große Vakuolen verteilt, die an Zahl gegen das hintere Ende zunehmen. Chromatinkörper konnte ich im Achsenstab nicht feststellen, während sie im Protoplasma gelegentlich zur Darstellung kamen.

Hervorheben möchte ich noch, daß ich in den von mir beschriebenen Trichomonaden niemals Bakterien einwandfrei nachweisen konnte, obwohl Diplokokken in genügender Menge teilweise in Leukozyten eingelagert im Substrat vorhanden waren und stark gefärbt erschienen. Wo es den Anschein hatte, daß solche von Trichomonaden phagozytiert sein könnten, lagen sie gewöhnlich nicht in gleicher Ebene mit diesen. Auch die gut erhaltene Form und Färbbarkeit dieser Keime legt mir die Vermutung nahe, daß es sich um Zu-

fälle bei der Färbung handelt und daß die hauptsächlichste Ernährungsweise der von mir beschriebenen Art in der Aufnahme gelöster Substanzen bestehen dürfte.

Die Frage der Zugehörigkeit zu der einen oder andern, in den Lehrbüchern beschriebenen Art, möchte ich heute noch nicht entscheiden. In Form und Größe ähnelt sie hauptsächlich der *Trichomonas vaginalis* der Frau, weniger der *Trichomonas caviae*. Von letzterer unterscheidet sie sich vor allem in der Form des Achsenstabs wesentlich (Keulenform). Die von Braune beschriebene *Trichomonas ruminantium* ist entschieden kleiner (8μ). In 2 Fällen hatte ich Gelegenheit, den Kot von Kühen zu untersuchen, in deren Föten ich Trichomonaden nachgewiesen hatte. Es ließen sich in ihren Faeces jedoch nie ähnliche Flagellaten finden. Wahrscheinlich handelt es sich um eine der *Trichomonas vaginalis* des Menschen nahestehende Art, für die ich den Namen *Trichomonas foetus* vorschlagen möchte¹⁾.

Pfenninger hat seiner Arbeit eine kurze Beschreibung der von ihm gefundenen Art angefügt, aus der immerhin hervorgeht, daß sie mit der meinen identisch ist. Er gibt einen ungefähren Längendurchmesser von 12—17 μ an.

Uebertragungsversuche.

Während Züchtungsversuche vielfach beschrieben wurden, fand ich Uebertragungsversuche in der Literatur nur wenig vermerkt. — Ich selbst versuchte, die Trichomonaden im Peritonealtranssudat bei Zimmer- und Brutschranktemperatur am Leben zu erhalten. Bei Brutschranktemperatur gelang dies höchstens 24—48 Std., bei Zimmertemperatur aber nicht länger als 3 Tage. Im aufgeschnittenen, faulenden Kadaver des künstlich infizierten Meerschweinchens konnten lebende Trichomonaden bei Zimmertemperatur bis zum 4. Tage nachgewiesen werden.

Bereits erwähnt habe ich einen Versuch, sie im dünnbreiigen Rinderkot zu züchten, was jedoch mißlang.

Mit Uebertragungsversuchen von Trichomonaden aus Föten hat sich vor mir Pfenninger beschäftigt. Es gelang ihm nicht, sie auf subkutanem Wege bei Kaninchen, Meerschweinchen und weißen Mäusen anzusiedeln. Auch Traugott gelang die Uebertragung der menschlichen *Trichomonas vaginalis* auf Meerschweinchen nicht.

Haupt hat sich mit der Frage der Pathogenität der *Trichomonas vaginalis* beschäftigt und Uebertragungsversuche mit Scheidensekret gesunder Frauen vorgenommen. 8 Tage nach vaginaler Applikation von 2—3 Oesen sah er starke Vermehrung der Protozoen ohne Auftreten irgendwelcher Reizerscheinungen der Scheide oder Veränderungen des Sekrets.

In den von uns beobachteten 9 Fällen von *Trichomonas*-Befunden bei Föten wurden 7mal Impfversuche an Meerschweinchen unternommen. In 1 Falle von subkutaner und weiteren 5 Fällen von intraperitonealer Verimpfung des trichomonadenhaltigen Labmageninhalts gelang die Uebertragung nicht. Ein Meerschweinchen zeigte später pathologisch-anatomisch und serologisch eine Abortus-Bang-Infektion. Die übrigen blieben gesund. Um so überraschender kam uns daher der Ausgang des Tierversuches aus dem Falle IX vom 22. 10. 27.

Das Meerschweinchen erhielt 0,5 ccm Labmageninhalt intraperitoneal injiziert, in welchem ich neben den Trichomonaden plumpe Diplokokken festgestellt hatte. Es starb am 7. 11. 27, also nach 16 Tagen, nachdem es in den letzten Tagen ziemlich teilnahmslos erschienen war.

1) Mazzanti hat seiner in 3 Fällen bei Rindern gefundenen Trichomonde den Namen *Trichomonas utero-vaginalis vitulae* gegeben. Mangels einer Beschreibung der Morphologie des Mazzantischen Protozoen ist ein Vergleich mit meiner *Trichomonas* nicht möglich.

Die Sektion ergab folgendes: Stark aufgetriebener Kadaver, Muskulatur blaß, beim Eröffnen der Bauchhöhle fällt sofort die große Menge (10 ccm) gelb-weißen, milchigen Peritonealexsudats auf. Das Peritoneum war stark injiziert, desgleichen die Darmserosa, leichte Leberdegeneration, die übrigen Organe o. B.

Im Ausstrich aus dem Peritonealexsudat finden sich neben vereinzelt Peritonealzellen und ziemlich zahlreichen Leukozyten eine Unmenge von lebhaft beweglichen Trichomonaden in Mischinfektion mit vereinzelt Diplokokken. Denselben Befund ergab die Untersuchung der Pleuraflüssigkeit.

In einer aus dem Herzblut des Meerschweinchens angelegten Bouillonkultur wurden neben den Diplokokken Coli ermittelt. 0.5 ccm dieser dickgewachsenen Kultur wurden auf ein Meerschweinchen subkutan überimpft. Es zeigte sich in den folgenden Tagen etwas hinfällig, erholte sich jedoch rasch und blieb bis zum Abschluß der Versuche gesund. Den Coli-Keimen dürfte jedenfalls nur eine akzidentelle Bedeutung zukommen, da sie im Ausgangsmaterial nicht gefunden wurden.

Impfversuche mit Meerschweinchen vom 7. 11. 27.

Mit dem aus obigem Versuch gewonnenen Peritonealexsudat wurde ein weiterer Impfversuch mit 2 trächtigen und 1 nichtträchtigen Meerschweinchen unternommen. Das Ergebnis war folgendes:

Meerschweinchen 1, trächtig:

7. 11. geimpft mit 0.5 ccm intraperitoneal. — 8. 11. Frühgeburt von 3 Jungen, davon 2 lebendig, eins tot (die lebendigen entwickelten sich später normal). Das Muttertier zeigt rötlich-schleimigen Vaginalausfluß, in welchem zahlreiche, lebhaft bewegliche Trichomonaden gefunden wurden. — 10. 11. Vulva noch immer geschwollen, in Vagina Unmenge von Trichomonaden nachweisbar. Der Ausfluß besteht fort. Allgemeinbefinden gut. — 11. 11. Allgemeinbefinden getrübt, Trichomonaden weiterhin in Scheidenausfluß nachweisbar. — 15. 11. Exitus. Sektionsbefund: Stark aufgetriebener Kadaver, Muskulatur blaß, wässrige, bzw. sulzige Beschaffenheit der Subkutis, Peritoneum injiziert, ca. 8 ccm gelbweißes, milchiges Peritonealexsudats, Magendarmserosa, sowie Gekröse injiziert, Magendarmschleimhaut o. B., Leber o. B., Nieren leicht hyperämisch. Geringe Menge Perikardflüssigkeit und Pleuraexsudat. — Mikroskopisch: Trichomonaden in großer Zahl in Peritoneal- und Pleura-, weniger zahlreich in Perikardflüssigkeit und ödematösen Stellen der Unterbrust. — Kulturen aus Herzblut (Bouillon Agar, Endo, Malachit) blieben steril.

Meerschweinchen 2, trächtig:

7. 11. geimpft mit 0.5 ccm intraperitoneal. — 10. 11. Abortus, 2 Föten mit Scheitelsteißblänge von ca. 5 cm. Starke Schwellung der Vulva des Muttertieres, massenhaft Trichomonaden in der Vagina nachweisbar. — Befund der Föten: Nr. 1: Eihäute zerrissen, Plazenta rosafarben. Sie wurden kurz durch die Flamme gezogen und aus dem Innern Saft auf Objektträger gebracht. Im Ausstrich konnten zahlreiche Trichomonaden festgestellt werden. Im Fötus selbst waren Trichomonaden nicht nachweisbar. — Nr. 2: Fötus im Amnion mit klarem Fruchtwasser eingeschlossen. Auch in diesem Falle erwies sich die vorher allseits abgeflammte Plazenta infiziert, während der Fötus selbst steril blieb. — 11. 11. 8 h Meerschweinchen stark komatös, liegt auf dem Bauch, stark aufgetrieben und gesträubtes Haarkleid, fühlt sich kalt an. Aus der Vagina ragt der Kopf eines 3. Fötus. Dieser wurde mit der Pinzette entfernt. — Befund des Fötus: Nr. 3: Trichomonas in Bauchhöhle, Leber, Lunge, Magen. Methylenblaupräparate negativ. 11. 11. 9 h Exitus. Sektionsbefund: stark aufgetriebener Kadaver, Vulva geschwollen, Umgebung stark benäßt, Muskulatur blaß, sulzige Infiltration an der Unterbrust, Perikardflüssigkeit, Pleuratranssudat, Lungenödem, Peritoneum stark injiziert, ca. 10 ccm gelbweißes Peritonealexsudats, Injektion der serösen Häute, insbesondere der Gebärmutter, Gebärmuttererschleimhaut blaurot, blutig-wässriger Inhalt, Vaginalschleimhaut hyperämisch. — Mikroskopisch lassen sich Trichomonaden in großer Menge im Peritoneal- und Pleuraexsudat, sowie im Gebärmutterinhalt nachweisen, in geringerer Anzahl in der Perikardflüssigkeit und vereinzelt wiederum in der Subkutis.

Meerschweinchen 3, nichtträchtig:

7. 11. 0.5 ccm wie oben. 10. 11. Hinfällig. — 11. 11. Matt, wenn umgeworfen nur mühsame Abwehrbewegungen. — 12. 11. Exitus. Sektionsbefund: Mäßig aufgetrieben, an der Unterbrust und der Subkutis wässrige Infiltration, Muskulatur saftreich, grau oder bläulich verfärbt, Peritoneum stark injiziert und fleckige Blutungen, ca. 10 ccm gelbbraunen Exsudats, Magendarmtraktus wenig gefüllt, linsengroße Rötung in der Dünndarmserosa, Leber, Herz, Lunge o. B., in der Brusthöhle Transsudat. Mikroskopisch wurden Trichomonaden im Peritoneal- und Pleuraexsudat in großer Menge nachgewiesen, vereinzelt in der infiltrierten Subkutis an der Unterbrust.

Impfversuche vom 11. 11. 27.

Es wurden geimpft: 1 Meerschweinchen trächtig, 1 unträchtig mit Peritonealflüssigkeit vom Meerschweinchen 2 aus Impfversuch vom 7. 11.

Meerschweinchen 1, trächtig:

11. 11. 0,3 ccm intraperitoneal. — 13/14. 11. Abortus, 3 Föten von ca. 8 cm Scheitelsteißlänge. Psyche etwas gedrückt, in Vagina teilweise lebende Trichomonaden, Temp. 37,3. — 15. 11. Allgemeinbefinden gut, Appetit, Ausfluß mit Trichomonaden, Temperatur 37,4. — 17. 11. Temperatur 37,9, Appetit, Ausfluß gelb-eitrig mit zahlreichen Trichomonaden. — 19. 11. Temperatur 38,1, Befinden unverändert. — 20. 11. Geringer Ausfluß, zahlreiche Epithelien und Trichomonaden. Das Tier erholt sich und blieb späterhin gesund.

Meerschweinchen 2, unträchtig:

11. 11. 0,2 ccm intraperitoneal. — 14. 11. Angestrengte Atmung, auf dem Bauch liegend, pochende Herzaktion, subnormale Temperatur, Pupillarreflex schwach. — 15. 11. Exitus. Sektionsbefund: stark aufgetrieben, Muskulatur blaßrot, Peritoneum stark injiziert, bläulich-rot, wiederum etwa 10 ccm gelblich-weißes Peritonealexsudat, Dünndarm stark gashaltig, Serosa injiziert, Dickdarm o. B., Leber blaßbraun mit gelbweißen, fibrinösen Auflagerungen, geringe Mengen Pleuratrassudat, Lungenödem. — Mikroskopisch: In Peritoneal- und Pleuraflüssigkeit Trichomonaden, in Magen-, Dinn- und Dickdarm keine Trichomonaden.

Impfversuche vom 15. 11. 27.

Es wurden wiederum geimpft: 1 Meerschweinchen trächtig, 1 Meerschweinchen nicht-trächtig mit Peritonealexsudat von Meerschweinchen 2 aus Impfversuch vom 11. 11., gestorben am 15. 11.

Meerschweinchen 1, trächtig:

15. 11. 0,5 ccm intraperitoneal. — 17. 11. Exitus. Sektionsbefund: aufgetriebener Kadaver, blasse Muskulatur, geringe, sulzige Infiltration der Subkutis, Vulva stark geschwellt. Blase hervortretend, im Beckeneingang zwei Föten eingezwängt, beim Öffnen der Bauchhöhle durch die Gebärmutter hindurch schimmernd drei Föten aus dem rechten Horn, einige Dünndarmschlingen leicht gerötet, auf der Leber gelbe, fibrinöse Auflagerungen, Lungenödem, Herz o. B. Mikroskopisch: Nachweis von Trichomonaden aus Peritonealexsudat und sulziger Subkutisinfiltration sowie in der Gebärmutter in großer Anzahl, in der Brusthöhle und Herzbeutel keine Trichomonaden. In der Plazenta der Föten nach sorgfältigem Abflammen wiederum Trichomonaden, in einem Fötus auch im Fruchtwasser und der Bauchhöhle einzelne Trichomonaden nachweisbar. — Kultur aus Herzblut und Gebärmutterinhalt steril, aus Peritonealexsudat geringe Trübung der Bouillon (Diplokokken).

Meerschweinchen 2, unträchtig:

15. 11. 0,4 ccm intravenös. — 16. 11. Keine krankhaften Erscheinungen, im Blut Trichomonaden nicht nachweisbar. — 17. u. 18. Blutausschrieb negativ. Meerschweinchen bleibt gesund (3 Monate später aus dem Versuch genommen).

Intravaginale Uebertragungsversuche auf Meerschweinchen.

Meerschweinchen 1, nichtträchtig:

15. 11. 0,5 ccm intravaginal (Peritonealexsudat von Meerschweinchen 2 vom Versuch 11. 11.) — 18. 11. Zahlreiche, lebhaft bewegliche Trichomonaden in der Vagina. — 19. 11. Geringer Ausfluß, zahlreiche Trichomonaden. — 20. 11. Unverändert. — 21. 11. Trichomonaden nicht mehr nachweisbar, zahlreiche Epithelien und Zystenformen (?).

Meerschweinchen 2, nichtträchtig:

15. 11. 2 ccm vaginal infiziert wie Nr. 1. — Nachweis der Erreger bis zum 21. 11. in ständig abnehmender Zahl.

Fütterungsversuche an Meerschweinchen, Kaninchen und Mäusen:

11. 11. 1) 2 Meerschweinchen, hochträchtig. — Per os (je 1 ccm Exsudat aus Meerschweinchen 2, gestorben am 11. 11.) — In beiden Fällen normale Geburt, Nachweis von Flagellaten nicht gelungen. — 2) 1 Kaninchen, trächtig. — Kein Abortus, Nachweis von Trichomonaden nicht gelungen. — 3) 2 Mäuse. — 2 ccm per os, lebende Trichomonaden im Kot nicht nachzuweisen.

Gleichfalls negativ sind noch weitere Uebertragungsversuche auf 2 Kaninchen verlaufen, welche einmal 1 ccm Peritonealexsudat intravenös und im zweiten Falle 0,5 ccm intraperitoneal injiziert bekamen, sowie Subkutaninjektionen auf Mäuse. 2 mit 0,2 ccm Exsudat intraperitoneal infizierte Mäuse starben schon nach 1—2 Tagen unter ähnlichen Erscheinungen wie die Meerschweinchen. Hühnerküken erwiesen sich refraktär.

Uebersichten wir das Ergebnis dieser Uebertragungsversuche, so müssen folgende Tatsachen hervorgehoben werden: In 3 Reihen von intraperitonealen Uebertragungsversuchen auf Meerschweinchen starben von 6 Tieren 5. Von 5 trächtigen Tieren kamen 4 ad Exitum, nachdem im 1. Falle eine Frühgeburt vorausging, 2 Tiere vorher abortiert hatten, während das 4. im Augenblick des Abortus starb. Ein Tier erholte sich nach dem Abortus rasch wieder. Im Kontrollversuch blieb ein Meerschweinchen, das intravenös mit Exsudat geimpft wurde, ohne Krankheitserscheinungen. Ein weiteres, das mit 24stünd., dickgewachsener Bouillonkultur aus Trichomonadenexsudat subkutan geimpft wurde, blieb am Leben und zeigte nur einige Tage leichte Benommenheit. Auch ein intravenös und ein intraperitoneal mit Trichomonadenexsudat geimpftes Kaninchen überlebte die Injektion ohne Krankheitserscheinungen.

6 Meerschweinchen, die zur Sektion kamen, zeigen einen einheitlichen pathologisch-anatomischen Befund.

Die Kadaver sind gewöhnlich stark aufgetrieben, die Muskulatur ist blaß, in der Subkutis der Unterbrust sieht man oft grauschimmernde, sulzige Infiltrationen, Peritonitis mit ca. 8—10 ccm trübweißem bis gelbbraunen, milchigen Exsudat, vereinzelt gelb-fibrinöse Auflagerungen auf der Leberoberfläche, Injektion der Magendarmserosa, in den meisten Fällen Pleuratrassudat und vereinzelt geringe Mengen Perikardflüssigkeit. Bei den trächtig gewesenen Tieren waren die Uterusschleimhaut und die Plazenta stark hyperämisch.

Auch der mikroskopische Befund dieser Fälle stimmt ziemlich überein. Stets wurden im Peritonealexsudat und im Uterus Unmengen von Trichomonaden gefunden, während sie in etwas geringerer Menge im Pleuratrassudat oder Herzbeutel zu sehen waren. Bemerkenswert ist der häufige positive Nachweis der Protozoen in den sulzigen Infiltrationen der Subkutis. Auch das Vorkommen in der Plazenta und teilweise in den Organen der länger im Uterus verbliebenen Föten verdient hervorgehoben zu werden. Nie wurden ähnliche Erreger im Magendarmtraktus der Meerschweinchen gefunden. Dabei muß erwähnt werden, daß sämtliche Probeentnahmen stets nacheinander und nach sorgfältigem Abflammen der Umgebung gemacht wurden, so daß ein Einwand, es könnte ein Ueberfließen des Exsudats auf benachbarte Organe stattgefunden haben, hinfällig wäre.

Interessant war die Beobachtung an dem in sterilem Reagenzglas aufgehobenen Peritonealexsudat, das jeweils 8—10 ccm ausmachte. Diese anfangs milchig getrübbte Flüssigkeit wurde, nachdem die Trichomonaden abgestorben waren, völlig klar und zeigte die Farbe einer gewöhnlichen Bouillon. Am Boden jedoch sammelte sich ein grauweißes Depot von ca. 2 ccm, das fast ausschließlich aus abgestorbenen Trichomonadenleibern bestand und dem Leukozyten und Epithelien in verhältnismäßig geringer Menge beigefügt waren. Diese immer wieder gemachte Beobachtung gibt einen ungefähren Begriff von der enormen Vermehrung der Trichomonaden, die jeweils im Meerschweinchenorganismus stattgefunden hatte.

Die mikroskopische bzw. kulturelle Untersuchung des Peritonealexsudats hat das stete Vorhandensein der bereits erwähnten Diplokokken in einzelnen Fällen in Mischinfektion mit Coli ergeben. Letzteren dürfte nur akzidentelle Bedeutung zukommen, da sie im Ausgangsmaterial nicht gefunden wurden und in späteren Impfversuchen wieder verschwanden. In einzelnen Fällen blieben

Herzblut und Uterusinhalt sogar steril. Obgleich den Diplokokken pathogene Bedeutung nicht abgesprochen werden kann — sie waren im Exsudat auch intrazellulär zu finden — so erwiesen sie sich in der 24 stünd. Bouillonkultur mit den Coli-Bakterien subkutan verimpft oder im Exsudat intravenös injiziert doch nur schwach virulent, wie wir aus den beiden oben angeführten, negativ verlaufenen Kontrollversuchen an Meerschweinchen ersehen können. Bei den beiden intravenös gespritzten Tieren, einem Meerschweinchen und einem Kaninchen, waren Trichomonaden nach 24 Std. im Blute nicht mehr nachweisbar.

Klinische Bedeutung.

Die Frage der Pathogenität der verschiedenen Trichomonaden wurde bis jetzt immer mit besonderer Vorsicht berührt, war doch eine direkte Beweisführung unmöglich, da alle Verfahren der Reinzüchtung auch modernster Art nicht zum Ziele führten. C. J. Schuurmann und A. Schuurmanns Bohkel Stuinink versuchten die Begleitbakterien mit Hilfe von Bakteriophagen zu eliminieren, leider ohne Erfolg. Ich hatte zwar in 2 Fällen Gelegenheit, mit sicheren Reinkulturen zu arbeiten, in diesen Fällen versagte jedoch der Tierversuch. Man könnte geneigt sein, aus diesem negativen Resultat den Schluß zu ziehen, daß diese Trichomonaden keine obligaten Parasiten seien. Da mir aber auch in weiteren 6 Fällen mit Mischinfektionen die Uebertragung nicht gelang, möchte ich die endgültige Beantwortung dieser Frage noch schuldig bleiben.

Pathogene Bedeutung hat man vielfach der *Trichomonas intestinalis* hom. zugesprochen. Ihr vermehrtes Auftreten in diarrhoischen Stühlen bestärkte die Untersucher in ihrer Auffassung und führte sicherlich nicht selten zu Irrtümern, indem die primäre Krankheitsursache unerkant blieb. Schon Leuckart äußerte 1863 seine Skepsis in Hinsicht auf diese Auffassungen (zitiert nach Kuczynski). Er war geneigt, einen gewissen Zusammenhang zwischen den krankhaften Prozessen und dem Auftreten der Parasiten anzuerkennen, bestände dieser zunächst auch nur darin, daß durch die krankhaften Zustände den Parasiten günstigere Lebensbedingungen geboten werden. Steigt dann aber die Menge der Parasiten ins Ungemessene, wie es oftmals der Fall ist, so mögen dieselben wohl auch ihrerseits zur Erhaltung und Verschlimmerung des Leidens beitragen.“

Vertreter der Gattung *Trichomonas* wurden auch bei den verschiedensten kranken und gesunden Tieren gefunden, so beim Schwein mit lobulärer Pneumonie (Wieting), bei Tauben mit Enteritis oder käsiger Leberentzündung (Rivolta, Jowett v. Ratz, Galli Valerio u. a.), bei Meerschweinchen mit Enteritis (Rivolta), ferner beim Rind, Hühnern, Mäusen, Ratten, Füchsen, Katzen, Hunden, Affen, bei Eidechsen und Schlangen. — Im Mittelpunkt des Interesses stand die Frage der klinischen Bedeutung der *Trichomonas vaginalis* in der Gynäkologie, seitdem Hoehne den Begriff der Trichomonadenkolpitis aufgestellt hat. Nach Haussmann 1870 sollte dieser Scheidenbewohner lediglich Begleiter entzündlicher Erscheinungen sein. Auch Marchand nahm an, daß erst durch die Veränderungen der normalen Verhältnisse in der Vagina die Bedingungen für ihre rasche Vermehrung geschaffen werden. Einen ähnlichen Standpunkt nimmt Arnold ein. Schröder und Löser prüften die Ergebnisse Hoehnes nach unter besonderer Berücksichtigung der Bakterienflora der Vagina. Sie sprachen die verunreinigte Scheidenflora als primäre Noxe an und betrachteten die Trichomonaden dabei als harmlose Flagellaten. Dieser Ansicht schloß sich auch Wolfring an, während Seitz eine bedingte Pathogenität annimmt.

Nach einer Arbeit Stephans aus dem Jahre 1921 vertritt Hoehne die Anschauung, daß den Trichomonaden eine indirekte Bedeutung zukomme, da ihre pathogene Wirksamkeit durch ihr symbiotisches Abhängigkeitsverhältnis begrenzt sei. Eine Anzahl von Tatsachen sprechen für seine Ansicht, obgleich ein direkter Beweis für deren Richtigkeit nicht vorliegt. Insbesondere Hoehnes Beobachtung, die von Schmid und Kamnicker bestätigt wird, daß trotz qualitativ gleichbleibender Vaginalflora Besserungen eintraten, sobald die Abtötung der Trichomonaden gelungen war, scheint sehr plausibel. Es entzieht sich jedoch unserer Beurteilung, wie weit er bei seiner Behandlungsmethode (Sublimatwaschungen mit nachfolgender Boraxglyzerinbestreichung) die Bakterienflora im Wachstum, ihren Fermentfunktionen und insbesondere in ihrer Virulenz beeinflusste. Eine erhebliche Stütze erfährt Hoehnes Anschauung andererseits durch die von mehreren Autoren gemachten Beobachtungen der ungünstigen Beeinflussung von Wochenbettsstörungen durch Trichomonaden (Gragert, Liß, Traugott, Wille, Littauer, Schmid und Kamnicker). Wertvolle klinische Beobachtungen haben auch Schmid und Kamnicker gemacht. Sie sprechen den Trichomonaden zum mindesten in einer Reihe von Fällen pathogene Bedeutung zu und machen sie für das Zustandekommen von Entzündungserscheinungen am äußeren Genitale und der Scheide, sowie für den damit verbundenen Fluor verantwortlich. Auch sie beobachteten, wie bereits erwähnt, die erhöhte Morbidität der Wöchnerinnen. Sie sahen die Trichomonaden in den oberflächlichen Epithelien der Scheidenwand nicht selten in größerer Menge auftreten, als im eigentlichen Vaginalsekret und führen 5 Fälle an, in denen sie die Flagellaten im Sekret vom ersten Reinheitsgrad antrafen. Diesen fügen sie einen weiteren Fall hinzu, in welchem sie die Trichomonaden in Reinkultur gefunden haben wollen, eine Feststellung, die anscheinend nur auf mikroskopischem Wege gemacht wurde. Auffallend war für mich, daß bei diesen 6 näher beschriebenen Fällen von 4 bereits schwanger gewesen Frauen 3mal Abortusfälle angeführt wurden, ohne daß die Verfasser auf Zusammenhänge mit der Trichomonadenkolpitis kommen. Obwohl ja in der Humanmedizin der kriminelle Abortus die Hauptrolle spielen dürfte, so wäre es immerhin interessant, die menschlichen Föten von Trichomonadenkolpitisfällen in dieser Richtung zu untersuchen. Vielleicht könnten dabei ähnliche Beobachtungen gemacht werden, wie sie hier beschrieben wurden.

Welche Faktoren sind es nun, die uns die klinische Bedeutung der in den Föten des Rinds gefundenen Trichomonaden nahelegen müssen? Die Beobachtung von Mazzanti und Ernst, welche sie in Scheide und Uterus gefunden haben, legen uns die Möglichkeit einer intra graviditatem eintretenden Invasion des Uterus nahe.

Die wiederholt gemachte Beobachtung, daß diese Protozoen die Fähigkeit besitzen, bis in den Magendarmkanal, in die Brust- und Bauchhöhle und in den Herzbeutel und selbst in die Lunge der Föten vorzudringen und sich dabei ins Unermeßliche zu vermehren — ich erinnere auch daran, daß ich schon nach 3—5 Tagen in 8—10 ccm Peritonealexsudat der Meerschweinchen ein fast nur aus Trichomonaden bestehendes Depot von 2 ccm festzustellen vermochte — kann wohl nicht ohne weiteres als ein für den Organismus unwesentlicher Vorgang angesehen werden. Allgemein wird bei der Trichomonadenkolpitis der Frau der starke Juckreiz hervorgehoben und es scheint mir nicht unwahrscheinlich, daß auch bei intra graviditatem erfolgter Invasion der Scheide und Gebärmutter des Rindes ein derartiger Reizzustand, das den Abortus auslösende Moment darstellt. Ob dieser Reiz lediglich mechanischer oder auch toxischer Natur ist, muß vorläufig dahin gestellt werden.

Nachdem mir in 2 Fällen mit sicheren Reinkulturen von Trichomonaden der experimentelle Abortus nicht gelungen ist, kann auch ich den Beweis nicht führen, daß die Trichomonaden die unmittelbare ätiologische Ursache der von uns beobachteten Trichomonadenabortusfälle darstellen können. Da solche Versuche aber auch bei Mischinfektionen versagt haben, muß die Frage offen bleiben. Ich möchte hier nicht so weit gehen, wie dies Haupt in seinen Schlüssen aus den negativ verlaufenen Uebertragungsversuchen mit Scheidensekret gesunder Frauen tut. Kennen wir doch bereits eine große Anzahl von Mikroorganismen, die als Saprophyten im Freien und im tierischen Organismus schmarotzen und erst durch Zusammentreffen disponierender Faktoren (Virulenzsteigerungen der Erreger und herabgesetzte Widerstandsfähigkeit des Organismus) oder durch Symbiose mit andern Erregern pathogene Eigenschaften erlangen. Auch in der vorliegenden Literatur sehen wir die Anschauung vorherrschen, daß erst die Symbiose, oder bereits pathologisch veränderte Sekrete günstige Existenzbedingungen für die Trichomonaden schaffen dürften. Auch mir ist die Ansiedelung auf intravaginalem Wege beim Meerschweinchen — allerdings nur in 2 Versuchen — nicht gelungen. Daß nach dem 6. Tage trotz Mitüberimpfung der Diplokokken lebende Trichomonaden nicht mehr nachzuweisen waren, erkläre ich mir einerseits mit der geringen Pathogenität der Diplokokken, die eine katarrhalische Affektion nicht mehr hervorzubringen vermochten, während andererseits die Trichomonaden in der gesunden, verhältnismäßig trockenen Vagina keine günstigen Fortpflanzungsbedingungen finden konnten.

Eine ungehemmte Entwicklung der Trichomonaden ist nur in entsprechendem, flüssigem Medium möglich, wobei nach Ansicht verschiedener Autoren die Reaktion derselben eine geringere Rolle spielen dürfte. In unseren Fällen war sie leicht alkalisch.

Ich neige zur Annahme, daß auch die in Scheide und Uterus des Rindes lebende Trichomonade erst durch vorhergehende katarrhalische Zustände der Schleimhäute beispielsweise bei der Vaginitis und Endometritis optimale Vermehrungsbedingungen erhält und nun ihrerseits an der Forzierung bereits bestehender, pathologischer Vorgänge teilhaben kann. Gelingt es ihr dabei, in den trächtigen Uterus vorzudringen, was mir nach den Erfahrungen aus den Meerschweinchenversuchen nicht mehr unwahrscheinlich vorkommt, so dürfte die rasche Vermehrung in der Plazenta und im Fruchtwasser, sowie das Vordringen in den Fötus auch bei sonst bakteriologisch sterilen Verhältnissen zum Abortus führen. Es wird sich daher im Einzelfall schwer entscheiden lassen, wie weit der eine oder andere Erreger dabei eine Rolle spielt, bzw. wie hoch die akzidentelle Bedeutung der Trichomonaden einzuschätzen ist, so wenig, wie man dies bei der Trichomonadenkolpitis der Frau jeweils auseinanderhalten kann. Eine andere Möglichkeit wäre die, daß Trichomonaden bereits vor der Konzeption in den Uterus eingetreten sind und als Zysten dort schlummern, bis sie mit fortschreitender Trächtigkeit neue Lebensbedingungen erhalten. In dieser Hinsicht müssen weitere experimentelle Arbeiten Klarheit schaffen.

Konnte in vorliegender Arbeit auch kein positiver Beweis für die unbedingte Pathogenität, der in den Rindsföten gefundenen Trichomonaden gebracht werden, so haben meine Beobachtungen doch gezeigt, daß die von mir beschriebenen Protozoen durch ihr Verhalten im Organismus des Rindes einer weiteren Untersuchung bedürfen.

Literaturverzeichnis.

- Arnold, M., Ztschr. f. gynäkol. Urol. Bd. 4. 1914. S. 215. — Baatz, P., Monatsber. f. Urol. Bd. 7. 1902. S. 457. — Bensen, W., Arch. f. Protistenkunde. Bd. 18. 1909. S. 115. —

Chatton, Ed., Compt. rend. Soc. de Biol. T. 83. 1920. p. 69. — Dock, G., Centralbl. f. Bakt. 20. — Doflein, F., Lehrbuch der Protozoenkunde. 1916. — Drescher, Ber. der 3. Jahrestagung der Fachtierärzte in München. Hannover (Schaper). 1925. S. 195. — Escomel, E., Bull. Soc. de Path. exot. T. 19. 1926. p. 697. — Gragert, O., Monatsschr. f. Geburtsh. Bd. 64. 1924. S. 37. — Haupt, W., Münch. med. Wochenschr. 1924. S. 204. — Haußmann, D., Die Parasiten der weibl. Geschlechtsorgane des Menschen u. einiger Tiere. Berlin (Hirschwald) 1870. — Hoehne, O., Centralbl. f. Gynäkol. 1916. Bd. 1. S. 4. — Jowett, Journ. Comp. Path. u. Therap. Bd. 20. 1907. — Katsunuma, S., Bull. Soc. de Path. exot. T. 17. 1924. p. 216. — Kofoid and Swezy, Proc. nat. Acad. Sc. Vol. 1. 1915. p. 315. — Kuczynski, M., Arch. f. Prot. Bd. 33. 1914. S. 119. — Kunstler, J., Bull. scient. T. 31. — Liss, W., Monatsschr. f. Geburtsh. Bd. 64. 1924. S. 31. — Littauer, Zentralbl. f. Gynäkol. 1923. Nr. 1. — Löser, A., Zentralbl. f. Gynäkol. 1922. S. 226. — Marchand, F., Centralbl. f. Bakt. Bd. 16. 1894. S. 74. — Mazzanti, E., Giorn. della R. Soc. Veterin. 1900. p. 629. — Miura, K., Centralbl. f. Bakt. Bd. 16. 1894. S. 67. — Neumann u. Mayer, Atlas u. Lehrb. wichtig. tierischer Parasiten u. ihrer Ueberträger. München (Lehmann) 1914. — Pfenninger, W., Münch. tierärztl. Wochenschr. 1927. S. 217. — Ponoschina, W., Russ. Journ. of trop. Med. 1923. p. 27. — v. Pro-wazek, S., Arb. a. d. Kais. Ges.-Amt. Bd. 21. — v. Ratz, St., Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 71. 1913. S. 184. — Schmid u. Kamniker, Arch. f. Gynäkol. Bd. 127. 1926. S. 362. — Schuurmann, C. J. et Schuurmann ten Boekel Stuinink, A., Ann. de l'Inst. Past. T. 41. 1927. p. 62. — Schröder u. Löser, Monatsschr. f. Geburtsh. u. Gynäkol. 1919. S. 23. — Seitz, A., Münch. med. Wochenschr. 1919. — Stefan, Zentralbl. f. Gynäk. 1921. S. 1565. — Traugott, Münch. med. Wochenschr. 1918. — Wieting, J., Centralbl. f. Bakt. Bd. 21. S. 721. — Wille, Med. Klin. 1918. S. 520. — Wolfring, Zentralbl. f. Gynäkol. 1921. S. 810.

Nachdruck verboten.

Untersuchungen über die Krebskrankheit bei Pflanzen, Tieren und Menschen.

Von **Rudolf Lieske.**

Mit 3 Tafeln.

	Seite
Einleitung	118
Der Pflanzenkrebs	119
Die Krebskrankheit bei Menschen und Tieren	121
Untersuchungen über <i>Bacterium tumefaciens</i>	125
Die Kopulation der <i>Tumefaciens</i> -Bakterien	128
Aus Krebstumoren isolierte Bakterien, die von dem <i>Tumefaciens</i> -Typ abweichen	129
Wie isoliert man den Krebserreger?	131
Die filtrierbare Form des Krebserregers	133
Sind die Krebskrankheiten bei Menschen, Tieren und Pflanzen gleiche oder verschiedene Erscheinungen?	134
Gibt es einen oder mehrere verschiedene Krebserreger?	136
Wie erfolgt die Infektion bei Menschen, Tieren und Pflanzen?	137
Vorkommen und Verbreitung des Krebserregers	138
Allgemein-bakteriologische Bemerkungen	141
Zusammenfassung	144
Literatur	145
Erklärung der Abbildungen	145

Seit einer Reihe von Jahren habe ich mich mit dem Studium der Krebskrankheiten bei Pflanzen, Tieren und Menschen beschäftigt und beabsichtigte, ausführliche Untersuchungen hierüber zu veröffentlichen. Aus äußeren Gründen sah ich mich veranlaßt, meine Arbeiten auf diesem Gebiete abzubrechen. Da ich kaum in der Lage sein werde, in absehbarer Zeit die Untersuchungen fortzu-

setzen, gebe ich im folgenden eine kurze Darstellung der bisher erzielten experimentellen Ergebnisse und der sich daraus ergebenden theoretischen Folgerungen. Daß es sich dabei um keine vollständige Bearbeitung des außerordentlich großen Fragenkomplexes handeln kann, bedarf keiner Erläuterung, hierzu standen mir weder die Zeit noch die Mittel zur Verfügung. Viele Punkte, deren Bearbeitung mir besonders wichtig erschien, konnten daher leider nur in großen Umrissen angedeutet werden.

Wohl kaum eine wissenschaftliche Frage hat jemals zur Äußerung so vieler verschiedener, oft entgegengesetzter Ansichten geführt, wie das Krebsproblem. Wie sich bei der Durchsicht der umfangreichen Literatur ergibt, spielt für die Beurteilung des Problems meist die Vorbildung der verschiedenen Autoren eine wesentliche Rolle, jeder sieht naturgemäß die Frage vom Standpunkte seiner Spezialwissenschaft aus in anderer Perspektive. Die Krebsfrage wurde bisher fast ausschließlich von Medizinern verschiedener Ausbildungsrichtung bearbeitet, größere Untersuchungen von Biologen anderer Schulung fehlen beinahe ganz. Die folgenden Ausführungen sollen nun das Problem vom Standpunkte der Pflanzenphysiologie und botanischen Bakteriologie beleuchten.

Der Pflanzenkrebs.

Die bei den verschiedensten Pflanzenarten nicht selten auftretenden krebsartigen Wucherungen wurden zuerst von Smith und Townsend (22) näher untersucht und beschrieben. Sie konnten aus den Geschwülsten ein Bakterium isolieren, das als *Bacterium tumefaciens* bezeichnet wurde. Mit Reinkulturen dieses zuerst aus einem Chrysanthemum kultivierten Organismus konnten bei Pflanzen derselben Art und auch bei vielen anderen Arten und Gattungen durch einfaches Einimpfen der Bakterien wieder die gleichen, typischen Tumoren erzeugt werden. Die Befunde wurden später von vielen anderen Forschern wiederholt und bestätigt. Mir standen im ganzen 14 verschiedene *Tumefaciens*-Stämme zur Verfügung, darunter ein Originalstamm von E. Smith und ein von Blumenthal aus einer Krebsgeschwulst des Menschen isolierter. Als Versuchspflanzen für viele Hunderte von Versuchen benutzte ich hauptsächlich *Datura Metel* und *Solanum nigrum macrocarpum*. Die Untersuchungen ergaben im Rahmen der folgenden Ausführungen nichts wesentlich Neues, sie bestätigten und erweiterten aber im allgemeinen die von früheren Autoren erzielten Befunde, von denen die wesentlichsten, hier interessierenden etwa folgende sind:

Der Pflanzenkrebs ist charakterisiert durch pathologische Zellwucherungen, die oft die Größe des ursprünglichen Organs um ein Vielfaches übertreffen können. Der Krebs tritt an fast allen Teilen der Pflanzen auf, in denen noch teilungsfähige Zellen sich befinden, in der Natur beobachtet man ihn meist an Wurzeln oder Stengel- bzw. Stammteilen, künstlich läßt er sich auch leicht an Blattstielen, Blättern, jungen Blüten und Früchten erzeugen.

Nach Smith und Townsend bildet *Bacterium tumefaciens* Stäbchen von etwa 0,6—1 μ Dicke und 1,2—1,5 μ Länge. Die Stäbchen sind einpolig begeißelt und tragen meist nur eine Geißel. Sie sind gramnegativ und nicht säurefest und wachsen auf fast allen in unseren Laboratorien üblichen Nährböden.

Mit Reinkulturen von *B. tumefaciens* kann durch einfaches Anstechen oder Anschneiden anfälliger Pflanzen mit Sicherheit der Krebs erzeugt werden. In unverletzte Pflanzenteile können die Bakterien nicht eindringen, durch

Aufimpfen von virulenten Bakterien auf unverletzte Pflanzen entsteht kein Krebs.

Aus echten Krebsgeschwülsten lassen sich meist die Bakterien leicht isolieren. Mit den isolierten Bakterien kann man oft neue Pflanzen infizieren, in vielen Fällen gelingt dies aber nicht, obwohl über die Identität der Tumefaciens-Bakterien kein Zweifel bestehen kann. Virulente Stämme behalten ihre Virulenz meist nur wenige Wochen oder Monate, ich beobachtete nur zwei Stämme, die jahrelang virulent blieben, und zwar einen Originalstamm von Smith, den dieser aus Hopfen isolierte, und einen Stamm, den ich aus Berncastler Weinreben kultivieren konnte.

In dem Tumorgewebe lassen sich in der Regel auch mit den besten bisher bekannten Untersuchungsmethoden die die Geschwulst verursachenden Bakterien nicht erkennen. In älteren Krebsknoten finden sich zuweilen einzelne Stäbchen, die aber wohl nicht *B. tumefaciens* sind, sondern andere, von außen eingedrungene Bakterien. Ueberträgt man Krebsgewebe, in dem Bakterien nicht nachweisbar sind, auf andere, gesunde Pflanzen, so entsteht dadurch eine neue Krebsgeschwulst, genau so, wie wenn man mit virulenten Bakterien geimpft hätte. Bringt man etwas von dem bakterienfreien Gewebe in geeignete Nährböden, so entwickeln sich in den meisten Fällen daraus wieder echte Tumefaciens-Bakterien. Der Krebserreger muß also in dem Gewebe in mikroskopisch nicht erkennbarer Form vorhanden gewesen sein.

Vielumstritten ist die Frage, ob bei Pflanzen Sekundärtumoren vorkommen, die man mit der Metastasenbildung beim Tier- und Menschenkrebs vergleichen könnte. Bei den hierauf bezüglichen Arbeiten ist meist schon die Fragestellung nicht einwandfrei. Es ist doch ganz selbstverständlich, daß der Vorgang bei Pflanzen der Metastasenbildung bei Menschen und Tieren nicht ohne weiteres entsprechen kann. Im Tierkörper können Teilchen der Geschwulst durch Lymphbahnen und Blutgefäße im ganzen Körper verschleppt werden und an den verschiedensten Stellen zu neuen Tumoren auswachsen. Da die Pflanzen entsprechende offene Leitbahnen gar nicht besitzen, kann auf diese Weise auch eine Verschleppung des Geschwulstmateri als nicht stattfinden. Eine Ausnahme bilden vielleicht nur die Milchröhren einzelner Pflanzengattungen, welche den Pflanzenkörper auf größere Strecken hin durchziehen, ohne durch Querwände abgeteilt zu sein, wie das bei den übrigen Leitbahnen, den Gefäßen und Siebröhren der Fall ist. Gerade bei diesen Pflanzen scheint aber der Tumefaciens-Krebs nicht oder nur selten vorzukommen, mir sind jedenfalls hierüber keine Angaben bekannt geworden. Versuche mit Euphorbiaceen hatten bei mir keinen Erfolg.

Amerikanische Forscher erklären, daß zuweilen scheinbare Sekundärtumoren dadurch entstehen, daß von einem Tumor ein Strang von Krebsgewebe (tumor strand) in dem gesunden Gewebe nach einer anderen, mehrere Zentimeter entfernt liegenden Stelle führt und dort wieder zu einer neuen Geschwulst auswächst. Solche Fälle kommen tatsächlich häufig vor, namentlich dann, wenn man virulente Bakterien in sehr junges Gewebe, am besten unmittelbar in die Nähe des Vegetationspunktes impft. Es wird dann beim Wachstum die infizierte Stelle auseinandergezogen, und die Tumoren kommen an verschiedenen, getrennt erscheinenden Stellen zur Entwicklung.

Ich habe aber wiederholt auch Sekundärtumoren beobachtet in Fällen, bei denen die Verbindungsstränge (tumor strands) bestimmt nicht vorhanden waren. Impft man junge Pflanzen von Tomaten oder *Datura Metel* in die Nähe des Sproßvegetationspunktes und schneidet den Sproßgipfel unmittelbar über der entstehenden Geschwulst ab, so treten zuweilen nach einiger Zeit an tiefer gelegenen Stellen des Stammes Krebswucherungen auf, aus denen

man die Bakterien wieder isolieren kann. Um Neuinfektionen kann es sich dabei nicht handeln, da die Geschwülste an äußerlich unverletzten Stellen auftreten. Ich nehme an, daß vielleicht in diesen Fällen der Krebserreger in filtrierbarer Form die Leitbahnen der Pflanze durchwandert. Zum exakten Beweis dieser Annahme müßten noch eingehendere Untersuchungen angestellt werden.

Als besonders wichtig für die Beurteilung des gegenwärtigen Standes der Krebsfrage muß betont werden, daß über den Verlauf der natürlichen Infektion der Pflanzen nichts bekannt ist. Wir wissen weder, ob und wo die Krebsbakterien in der freien Natur vorkommen, noch wie und auf welchem Wege sie in die Pflanzen gelangen. Wir können in manchen Fällen, z. B. beim Krebs (Mauke) der Weinreben, eine gewisse Abhängigkeit der Infektionen von Boden- und Witterungsverhältnissen feststellen, genauere Untersuchungen liegen aber auch hierüber nicht vor (vgl. Lieske, 11).

Vorstehende Angaben enthalten die wichtigsten, im Rahmen der folgenden Ausführungen interessierenden Tatsachen über den Pflanzenkrebs. Zu eingehenderer Orientierung sei das vorzügliche Lehrbuch der Bakterienkrankheiten von E. Smith (21) empfohlen.

Smith, der Entdecker des Pflanzenkrebses, war auch der Erste, der darauf hinwies, daß die Erscheinungen des durch *Bacterium tumefaciens* hervorgerufenen Pflanzenkrebses gewisse Ähnlichkeiten mit dem Krebs der Menschen und Tiere zeigen. Irgendeinen stichhaltigen Beweis für die Gleichheit der Erscheinungen vermochte er jedoch nicht zu erbringen. Bei den Medizinnern und auch bei den Biologen fanden seine Angaben kaum ernstliche Beachtung. Hohes Interesse gewannen die Ausführungen erst, als im Jahre 1924 von Blumenthal, Meyer und Auler (4) gefunden wurde, daß in echten Krebsgeschwülsten des Menschen Bakterien vorkommen, die dem *Bacterium tumefaciens* gleich oder sehr nahestehend sind.

Die Krebskrankheit bei Menschen und Tieren.

Die Erscheinungen der Krebskrankheit bei Menschen und Tieren sind sehr mannigfaltig, die Abgrenzung des echten Krebses von ähnlichen Geschwulstbildungen ist nicht immer leicht. Die folgenden Ausführungen beziehen sich jedenfalls nur auf Tumoren, die sich fortschreitend entwickeln, die häufig im befallenen Gewebe Sekundärgeschwülste (Metastasen) bilden, und die, was besonders wichtig ist, auf andere Individuen übertragbar sind und sich nach der Uebertragung in gleicher Weise weiter entwickeln wie im ursprünglichen Organismus. Es handelt sich also in erster Linie um Karzinome, Sarkome und diesen nahestehende Geschwülste.

Ein äußerst interessantes Kapitel ist das Studium der verschiedenen Theorien, welche die Ursachen des Krebses erklären wollen. Ihre Zahl ist fast unübersehbar, es finden sich darunter viele, die manche Wahrscheinlichkeit für sich haben, es finden sich andere, die geradezu grotesk erscheinen. Es ist mir nicht möglich, hier auch nur andeutungsweise auf alle diese Theorien einzugehen, die hier berücksichtigten Arbeiten sind jedem Krebsforscher bekannt, der dem Gebiete Fernerstehende findet sie in den seit 1924 erschienenen Bänden der Zeitschrift für Krebsforschung veröffentlicht bzw. angeführt. Ueber den gegenwärtigen Stand der Krebsfrage orientieren außerdem schnell die auf der letzten Tagung der Mikrobiologen in Wien gegebenen Referate namhafter Krebsforscher, die im Centralblatt für Bakteriologie (1) abgedruckt sind. Die angegebenen Mitteilungen werden im folgenden als bekannt vorausgesetzt.

Das positivste Ergebnis der Lektüre der angeführten Arbeiten dürfte die Erkenntnis der Tatsache sein, daß wir heute von einer einheitlichen, allgemein anerkannten Erklärung der Ursachen der Krebskrankheit weiter entfernt sind denn je. Die weitaus meisten Forscher, die sich selbst näher mit der Krebsfrage befaßt haben, vertreten eine Theorie, die einer der drei folgenden Gruppen angehört:

1) Das Krebsproblem wird als „Stoffwechselproblem“ oder als „zellphysiologisches Problem“ aufgefaßt, d. h. gewisse, nicht näher bekannte Veränderungen der normalen Funktionen der Zelle bzw. des gesamten Organismus verursachen ein hemmungsloses Wachstum einzelner Zellen.

2) Äußere, chemische oder physikalische Reize verschiedenster Art verursachen den Krebs.

3) Die Krebskrankheit wird durch einen oder mehrere verschiedene Erreger belebter Natur (Bakterien, tierische Parasiten, filtrierbare Vira usw.) hervorgerufen.

Betrachtet man die hier angedeuteten Theorien vom Standpunkte der Pflanzenphysiologie und allgemeinen Bakteriologie, so ergeben sich folgende Gesichtspunkte:

1) Es ist durchaus denkbar, daß abnorme Stoffwechselvorgänge innerhalb eines Organismus krebsartige Wucherungen hervorrufen. Es könnte z. B. die in ausgezeichneter Weise von Warburg erforschte Milchsäurebildung in den Krebszellen zur Entstehung weiterer Zellwucherungen Anlaß geben, womit eine Verbindung mit den Reiztheorien hergestellt wäre. Auch andere abnorme Zellfunktionen könnten eine Geschwulstbildung verursachen. Die Theorie versagt aber vollständig, sobald man die Uebertragbarkeit der Krebswucherungen berücksichtigt. Wenn man eine Krebsgeschwulst viele Jahre lang fortgesetzt auf hunderte andere gesunde Individuen übertragen kann, wie das mit vielen in unseren Laboratorien fortgezüchteten Tumoren tatsächlich geschieht, so kann dabei von einem Stoffwechselproblem oder einem zellphysiologischen Problem keine Rede sein, zumal wenn man das Tumormaterial vor der Uebertragung durch Aufbewahren im Eisschrank oder durch wochenlanges Trocknen abtötet, oder wenn man zellfreie Filtrate verwendet. Unbedingt ausgeschlossen sind diese Theorien außerdem durch die Tatsache, daß in zahlreichen Fällen die Uebertragung von Krebstumoren auf Individuen artfremder Organismen gelungen ist. In der gesamten Biologie finden wir kein Analogon, das auch nur im entferntesten im Sinne der zellphysiologischen Theorien mit der Erscheinung der übertragbaren Geschwülste vergleichbar wäre; diese Theorien widersprechen allen Erfahrungen der Biologie. Für meine Versuche, das Krebsproblem aufzuklären, habe ich daher von vornherein darauf verzichtet, in dieser Richtung zu arbeiten, es sollte gerade in erster Linie versucht werden, den Punkt aufzuklären, der diese Theorien ausschließt: die Uebertragbarkeit der Krebskrankheit.

2) Daß äußere chemische oder physikalische Reize abnorme Zellwucherungen verursachen können, ist allgemein bekannt. Auch auf botanischem Gebiete lassen sich hierfür viele Beispiele anführen. In dem bereits erwähnten Lehrbuche der Pflanzenkrankheiten von E. Smith findet sich z. B. eine Reihe von Versuchen mit guten Abbildungen beschrieben, die zeigen, daß man auf Blättern und anderen Pflanzenteilen krebsartige Wucherungen durch Säuren und Alkalien (z. B. Ameisensäure, Milchsäure, Ammoniak usw.) hervorrufen kann (s. Fig. 10). Unter natürlichen Verhältnissen können bei fast allen Pflanzen tierische und pflanzliche Parasiten pathologische Zellwucherungen (Gallen) erzeugen. Es braucht nicht erwähnt zu werden, daß sowohl die künst-

lich erzeugten Wucherungen als auch die in der Natur vorkommenden Gallen nicht übertragbar sind, sofern man nicht auf der neuen Pflanze erneut den ursprünglichen Reiz wieder ausübt.

Ähnliche Vorgänge treten in mannigfaltigster Form bei Menschen und Tieren auf. Es können hier Zellwucherungen entstehen durch die verschiedenartigsten physikalischen und chemischen Reize, z. B. durch Röntgenstrahlen, Wärmestrahlen, mechanische Einflüsse, Teerpinselungen, Anilin, Arsen sowie durch verschiedene tierische Parasiten. Hierbei müssen aber zwei verschiedene Arten der Geschwulstbildung streng auseinander gehalten werden. In den weitaus meisten Fällen hört die Entwicklung der Geschwulst auf, sobald der äußere Reiz verschwindet. Diese Art der Geschwülste hat mit dem echten Krebs nichts zu tun, sie entsprechen etwa den auf Blättern durch Säure erzeugten Zellwucherungen. In einzelnen Fällen gelingt es aber zweifellos, durch Reizmittel echte Krebstumoren zu erzeugen, die sich auch nach dem Aufhören des Reizes ungehemmt weiter entwickeln, die unter Umständen Sekundärgeschwülste (Metastasen) bilden und die auf andere Individuen übertragbar sind. Die Entstehung echter Krebse durch Reizmittel ist so oft einwandfrei beobachtet worden, daß an der Tatsache keinerlei Zweifel bestehen werden kann, erscheint zweifelhaft. Betrachtet man die umfangreiche Literatur über „Reizkrebse“, so zeigt sich, daß auch nicht eine einzige Angabe ausschließt, daß die wirkliche Krebsursache ein Parasit ist, dem lediglich durch die angewendeten Reize die Möglichkeit der Infektion gegeben wurde. Soweit ich die Literatur übersehen kann, ist der Versuch, Reizkrebse unter sterilen Bedingungen zu erzeugen, noch niemals ausgeführt oder überhaupt nur in Betracht gezogen worden. Er würde wohl auch auf unüberwindliche Schwierigkeiten stoßen. Die Erzeugung von Krebsen durch steril eingespritzte, sogar selbst antiseptische Substanzen schließt eine Infektion keineswegs aus.

Es ergibt sich also, daß die Reiztheorien zwar nicht ohne weiteres abzulehnen sind, da viele experimentelle Tatsachen für sie sprechen, daß aber andererseits auch keinerlei Beweis für ihre Richtigkeit vorliegt. Vor allem ist es wieder die Uebertragbarkeit des Krebses, welche erhebliche Zweifel darüber aufkommen läßt, daß man als Krebsursache eine reine Reizwirkung annehmen könnte.

3) Die Annahme, daß ein spezifischer Erreger die Ursache der Krebskrankheit ist, hatte in früheren Jahren viele Anhänger. Es zeigte sich aber immer wieder, daß die gefundenen Organismen nicht als Krebserreger in Frage kamen. Die großen Erfolge, die auf dem Gebiete der Reiztheorie erzielt wurden, machten die Infektionstheorie immer unwahrscheinlicher, so daß sie später von der weitaus größten Menge der Mediziner glatt abgelehnt wurde. Erst in den letzten Jahren wandte sich das allgemeine Interesse dieser Ansicht wieder zu, als es nämlich verschiedenen Forschern gelang, aus echten Krebsgeschwülsten Organismen zu isolieren, mit den erzielten Reinkulturen wieder neue Tiere zu infizieren und dadurch echten Krebs zu erzeugen.

Den Engländern Gye und Barnard (9) gelang es zuerst, nachzuweisen, daß zellfreie Filtrate von Hühnersarkomen wieder echte Sarkome hervorrufen können. Die Wirksamkeit zellfreier Filtrate konnte später auch von anderen Forschern gezeigt werden. Es ist jedenfalls einwandfrei erwiesen, daß man einen Stoff, der alle Eigenschaften eines belebten Virus zeigt, bis zu einer bestimmten Porengröße durch Kerzen filtrieren kann, und daß man mit diesen Filtraten wieder Krebsgeschwülste erzeugen kann. Manche Forscher schließen hieraus, daß ein filtrierbares Virus der spezifische Krebserreger ist.

Im Jahre 1924 gelang es Blumenthal, Auler und Meyer (4), aus echten Krebstumoren des Menschen Bakterien zu züchten, die dem *Bacterium tumefaciens*, dem Erreger des Pflanzenkrebses, sehr nahe standen oder die mit ihm identisch waren. Mit einzelnen dieser Stämme konnte nicht nur bei Versuchstieren, sondern auch bei Pflanzen echter Krebs durch Einimpfen der Bakterien erzeugt werden. Zu den gleichen Ergebnissen kam später Kauffmann (10), der ähnliche Bakterien aus einem Mäusekarzinom isolierte. Die ersterwähnten Autoren neigten anscheinend anfangs dazu, das *B. tumefaciens* als spezifischen Krebserreger anzusehen, in neueren Mitteilungen Blumenthals ist jedoch die Ansicht vertreten, daß diese Bakterien lediglich die Rolle eines äußeren Reizes übernehmen, oder daß sie vielleicht nur Ueberträger eines noch unbekannten spezifischen Erregers sind.

Eine andere Gruppe von Bakterien, die aus Krebstumoren isoliert werden konnten, beschrieb der Engländer Glover (8). Es handelt sich um morphologisch stark variierende Formen, die grampositive Stäbchen bilden können. Ähnliche Befunde machten Scott (20), Loudon und Cormack (14) und in Deutschland Binz und Räth (3). Englische Forscher halten den Glover-Bazillus für den echten und einzigen Krebserreger.

In Amerika fand zuerst Nuzum (15) in Krebsgeschwülsten regelmäßig Streptokokken; über ähnliche Erfolge berichtet Ochsner (16). Viele Amerikaner halten den Nuzum-Streptokokkus für den einzigen und echten Krebserreger.

Es wurden also bisher mindestens vier grundverschiedene Mikroorganismen als Krebserreger angesehen, und zwar ein filtrierbares Virus, gramnegative, einpolig begeißelte Bakterien (*Tumefaciens*-Gruppe), grampositive Bazillen (Glover-Räth-Gruppe) und Streptokokken (Nuzum-Gruppe). Es besteht gar kein Zweifel darüber, daß alle diese Organismen wirklich und einwandfrei aus echten Krebsgeschwülsten von Menschen und Tieren isoliert wurden, und daß man mit allen diesen verschiedenen Formen durch Einimpfen von Reinkulturen in den Tierkörper wieder echte Krebsgeschwülste erzeugen konnte.

Dieses Ergebnis ist natürlich wenig ermutigend für die verhältnismäßig wenigen Anhänger der Infektionstheorie. Der Krebs ist eine so gut charakterisierte und typische Krankheit, daß man nicht annehmen kann, daß eine Reihe ganz verschiedener Erreger dasselbe Krankheitsbild erzeugen können. Der beste Ausweg scheint noch die von verschiedenen namhaften Krebsforschern vertretene Ansicht zu sein, daß zwar die genannten Organismen nicht selbst als Krebsursache in Betracht kommen, daß sie aber vielleicht den eigentlichen Erreger übertragen oder durch den von ihnen ausgeübten Reiz die Krankheit auslösen.

Betrachtet man vom pflanzenphysiologischen Standpunkte aus die vorerwähnten drei Gruppen von Krebstheorien, so muß man zu dem Schluß kommen, daß keine von ihnen einwandfrei erscheint. Unbedingt abzulehnen oder stark zu bezweifeln sind die Stoffwechsel- und Reiztheorien, da keine von diesen die Uebertragbarkeit des Krebses erklären kann. Die Uebertragbarkeit kann nur durch einen belebten und vermehrungsfähigen Erreger erklärt werden. Die Tatsache aber, daß eine ganze Reihe von verschiedenen Organismen gefunden wurde, die von ihren Entdeckern als Ursache des Krebses angesehen werden, macht es zunächst wenig wahrscheinlich, daß diese tatsächlich die spezifische Krankheitsursache sind.

Ich habe mich nun bemüht, möglichst unabhängig von den bisher erzielten Befunden die Ursachen der Krebskrankheiten zu untersuchen. Für den Botaniker liegt es natürlich nahe, zunächst einmal genau vorhandene

oder fehlende Analogien zwischen der Krebskrankheit bei Menschen, Tieren und Pflanzen festzustellen.

Untersuchungen über *Bacterium tumefaciens*.

Durch die Untersuchungen von Blumenthal, Auler und Meyer sowie durch die von Kauffmann (10) wurde mit Sicherheit erwiesen, daß mit Bakterien, die dem *Bacterium tumefaciens* gleich oder ähnlich waren, durch Einimpfen von Reinkulturen echter Krebs bei Versuchstieren und bei Pflanzen erzeugt werden kann, und zwar in manchen Fällen durch Anwendung ein und desselben Stammes.

Einer Nachprüfung bedarf nun zunächst der Begriff „*Bacterium tumefaciens*“. Diese Bezeichnung wurde im Jahre 1907 von Smith und Townsend (22) für den aus *Chrysanthemum*-Tumoren isolierten Erreger des Pflanzenkrebses aufgestellt. Nach den Angaben von Smith hat der Organismus folgende Eigenschaften: „Stäbchen von etwa 0,6—1 μ Dicke und 1,2 bis 1,5 μ Länge. Die Stäbchen sind beweglich, polar begeißelt, sporenlos, gramnegativ, nicht säurefest, nicht nitratreduzierend, aërob, nicht gasbildend. Sie bilden keine Amylase, sind empfindlich gegen Austrocknen und gegen Belichtung, sie sind chloroformfest, vertragen bis zu 3,5 Proz. Kochsalz, bilden ein Labenzym und mit verschiedenen Zuckern Säure. Die Kolonien sind auf Agar klein, rund, etwas erhaben, feucht, durchscheinend. Milch gerinnt, Lackmusmilch wird gebläut, Lackmus oft reduziert, Kongorot wird von den lebenden Bakterien aufgenommen. Das Bakterium verträgt wenig Säure, noch weniger Alkali. Wachstumstemperatur zwischen 0 und 37°. Wird in 10 Minuten bei 51° getötet.“

Ich habe im ganzen 14 verschiedene, echte, aus Pflanzentumoren isolierte *Tumefaciens*-Stämme lange Zeit genau untersucht. Im allgemeinen sind die Angaben von Smith für alle Stämme zutreffend. Abweichungen liegen vor vor allem bei dem Wachstum in Milch. Milch wird von vielen Stämmen, die schon längere Zeit kultiviert wurden, nicht koaguliert. Eine Bläung von Lackmusmilch tritt nur bei wenigen Stämmen auf, manche lassen diese unverändert, andere entfärben sie, manche röten sie. Viele Stämme färben reine Milch nach mehreren Wochen leicht bräunlich. Die Größenverhältnisse der Stäbchen sind sehr großen Schwankungen unterworfen. Ganz junge, frisch isolierte Stämme zeigen kurze, plumpe Stäbchen, die einpolig begeißelt sind (s. Fig. 1). Es findet sich meist nur eine Geißel, die etwas seitlich ansitzt. Zuweilen finden sich in einer Kultur Stäbchen mit 2—5 Geißeln, diese treten aber nur vereinzelt auf. Regelmäßig schopfig begeißelte Bakterien mit 5 und mehr Geißeln gehören zu einem anderen Typus der Gruppe des *B. fluorescens*. Nach längerer Kultur auf Agarnährböden werden die Stäbchen länger und dünner, sie lassen sich dann nur schlecht färben, sind unbeweglich und haben keine Geißeln mehr (s. Fig. 3). Kauffmann z. B. bildet in sehr typischer Weise einen solchen Stamm ab. Es erklärt sich hieraus, daß das bei entsprechenden Kultur immer bewegliche und begeißelte *B. tumefaciens* von verschiedenen Autoren als unbeweglich beschrieben wird.

Die Begeißelung ist in allen Fällen das wichtigste Erkennungsmerkmal. Echte *Tumefaciens*-Stämme zeigen meist keine Gelatineverflüssigung und keine Gasbildung. Von beiden Merkmalen kommen namentlich bei frisch isolierten Stämmen selten Ausnahmen vor. Viele frisch isolierte Stämme zeigen außerdem oft eine ausgesprochene Fluoreszenz des Nährbodens; sie koagulieren und säuern leicht, was sie später nicht mehr tun.

Ein weiteres, für die Diagnose und Isolierung wichtiges Merkmal ist das Wachstum auf folgendem, sehr selektiv wirkenden Spezialagar:

Glyzerin 2 Proz.,
Kaliumnitrat 0,5 Proz.,
Saures phosphors. Kalium (KH_2PO_4) 0,1 Proz.,
Magnesiumsulfat 0,01 Proz.,
Agar 2 Proz.,
destilliertes Wasser.

Das Magnesiumsulfat kann für die meisten Versuche auch fortgelassen werden.

Der Agar darf nicht im Autoklav mit Ueberdruck sterilisiert werden, da er sonst nicht fest wird. Bei richtiger Herstellung erscheint er vollkommen klar und durchsichtig. Alle von mir kultivierten Tumefaciens-Stämme wuchsen auf ihm vorzüglich, während das Wachstum aller nicht in diese Gruppe gehörigen Mikroorganismen auf ihm verhindert oder stark gehemmt wird. Man kann dem Agar noch verschiedene Farbstoffe oder andere Reagenzien zusetzen, ich habe ihn am vorteilhaftesten immer in der obigen Zusammensetzung angewendet. Im folgenden bezeichne ich den für das Arbeiten mit Krebsbakterien für mich unentbehrlich gewordenen Agar als „Krebsagar“, die entsprechende Lösung ohne Agarzusatz als „Krebslösung“.

Eine für die Krebsforschung wichtige und viel zitierte diagnostische Untersuchung wurde von Reichert (18) ausgeführt. Er untersuchte 11 von Blumenthal aus menschlichen Krebstumoren isolierte Stämme und kommt zu dem Schluß, daß es sich dabei zum Teil um wesentlich verschiedene Bakterienarten handelt. Betrachtet man seine Ausführungen näher, so ergibt sich folgendes: Das wichtigste Merkmal, die Begeißelung, ohne deren genaue Untersuchung ich eine Identifizierung des *B. tumefaciens* für ausgeschlossen halte, wird vom Verfasser überhaupt nicht erwähnt; es fehlt auch sonst jede morphologische Angabe. *B. tumefaciens* bezeichnet er als unbeweglich. Einen Stamm (Hübner), der keinerlei Verwandtschaft mit den übrigen Stämmen aufweisen soll, hält Verf. anfangs wegen der Eigenschaft, sich über die Oberfläche des Agars auszubreiten, für *Proteus*, nimmt aber später an, daß es sich um einen Vertreter der *Pyocyaneus*-Gruppe handelt. Ein einziges Geißelpräparat hätte diese Frage entschieden. Es gibt kein einziges konstantes Merkmal, durch das sich *B. pyocyaneum* von *B. tumefaciens* unterscheidet. Die Eigenschaft, die Agaroberfläche zu überwachsen und anfangs Gelatine zu verflüssigen, zeigen manche frisch aus Tumoren isolierte Stämme.

Als wichtigsten Beweis für die Identität oder nahe Verwandtschaft der Stämme sieht Reichert die serologische Reaktion (Agglutination) an, ein Irrtum, der leider weit verbreitet ist. Die Serologie leistet für die Diagnose verschiedener Infektionskrankheiten hervorragende und unersetzliche Dienste, für Verwandtschaftsreaktionen ist sie bei Bakterien nur mit allergrößter Vorsicht zu gebrauchen. Ein positiver Ausfall der Reaktion macht eine Verwandtschaft wahrscheinlich, ein Beweis hierfür ist er nicht, ein negativer Ausfall der Reaktion besagt nichts, absolut nichts. Daß gerade für die Identifizierung der Tumefaciens-Stämme die Serologie versagt, wurde bereits vor langer Zeit von Smith nachgewiesen.

Die Arbeit von Reichert wird von den Gegnern der Infektionstheorie viel zitiert, da sie beweisen soll, daß das von Blumenthal isolierte Bakterienmaterial ganz heterogenen Arten angehört. Ich kann mich nach sehr eingehendem Studium der Arbeit dieser Ansicht keineswegs anschließen. Sie enthält auch nicht eine einzige Angabe, aus der mit Sicherheit eine Abweichung hervorginge, die außerhalb der natürlichen Variationsbreite des *B. tumefaciens*

liegt. Eine genaue Entscheidung läßt sich natürlich ohne experimentelle Nachprüfung nicht treffen.

Es entsteht nun die Frage, wie der Begriff „*Bacterium tumefaciens*“ überhaupt zu definieren ist. Die Pflanzenpathogenität dieses Organismus, die bei der Aufstellung der Artbezeichnung die ausschlaggebende Rolle spielte, ist ein ganz variabler Faktor, der für eine Artabgrenzung nicht in Frage kommt. Die meisten zurzeit in Kultur befindlichen Stämme sowie auch sehr viele, frisch aus Pflanzentumoren isolierte Stämme sind nicht virulent. In der Natur finden sich weit verbreitet, namentlich in Wasser und Erde, zahlreiche Formen, die in keiner Weise von diesen Stämmen zu unterscheiden sind. Wir wissen nicht, ob und unter welchen Bedingungen diese pathogen werden können. Sieht man von der Pathogenität ab, so ergibt sich, daß *B. tumefaciens* sich von anderen, allgemein bekannten Organismen nicht unterscheiden läßt. Es handelt sich hierbei um Vertreter der Fluoreszentengruppe, die von mir wiederholt eingehend studiert wurde. Wir finden in dieser Gruppe alle Uebergänge von den als *B. pyocyaneum* und *B. fluorescens* bezeichneten Stämmen zu den farblosen, Gelatine nicht verflüssigenden und auch zu den gasbildenden Vertretern dieser Gruppe. *Bacterium pyocyaneum*, *B. fluorescens*, *B. putidum* (= *B. fluorescens non liquefaciens*), *B. punctatum* und ähnliche Formen sind keine „Bakterienarten“, sondern es handelt sich um abweichende Stämme einer großen Gruppe. Es finden sich zwischen den einzelnen typischen Formen nicht nur alle Uebergänge, sondern es sind auch wohl alle morphologischen und physiologischen Merkmale, die zur Unterscheidung der „Arten“ angewendet werden, nicht konstant, es kann also z. B. ein stark farbstoffbildender Stamm farblos werden, ein Gelatine verflüssigender Stamm kann diese Eigenschaft verlieren, das Vermögen, Milch zu koagulieren oder Gas aus Zucker zu bilden, kann erworben oder verloren werden usw. Eine gewisse Beständigkeit scheint, soweit ich bisher beobachten konnte, die Zahl der Geißeln zu besitzen. Die Stämme sind entweder vorwiegend einkeiellig oder vorwiegend 5 bis mehrkeiellig.

Alle von mir bisher beobachteten Pflanzen-, Tier- und Menschenkrebs erzeugenden Stämme zeichnen sich durch folgende Merkmale innerhalb der *Fluorescens*-Gruppe aus: Sie sind vorwiegend einkeiellig, die Geißel sitzt etwas seitlich an einem Ende der kurzen, plumpen Stäbchen (unbegeißelte Stäbchen können ganz andere Formen annehmen), sie bilden wenig oder gar keinen Farbstoff, nur sehr seltene Stämme bilden anfangs Gas und verflüssigen Gelatine. Diese zeichnen sich in Kulturen dadurch aus, daß sie im Gegensatz zu den meisten Stämmen sich leicht über die Agaroberfläche ausbreiten. Fast alle Stämme wachsen gut auf dem oben angegebenen „Krebsagar“. Die Form der Stäbchen ist außerordentlich variabel, sie wird durch verschiedene Nährböden weitgehend beeinflußt, ändert sich aber mit der Zeit auch auf demselben Nährboden. Die plumpen begeißelten Kurzstäbchen werden dann meist lang und dünn und lassen sich schlecht färben.

Streng genommen ist der von Smith aufgestellte Name: *Bacterium tumefaciens* unzulässig, da für die Artabgrenzung innerhalb der *Fluorescens*-Gruppe nur die Pflanzenpathogenität herangezogen werden könnte, ein Faktor, der aber nicht konstant und daher zur Artbestimmung unbrauchbar ist. Aus Zweckmäßigkeitsgründen wird aber auch im folgenden für die Bezeichnung der oben umgrenzten Organismengruppe der Name *B. tumefaciens* vorläufig beibehalten.

Die Kopulation der „*Tumefaciens* - Bakterien“.

Bei meinen Versuchen mit Reinkulturen von *Bacterium tumefaciens*, die aus Tumoren von Menschen oder Pflanzen gewonnen waren, beobachtete ich wiederholt, daß die Bakterien sich in Milch nur spärlich oder gar nicht vermehren. Läßt man die beimpften Milchröhrchen bei ungefähr 30° einige Tage stehen, und untersucht sie dann mikroskopisch in frischen oder gefärbten Präparaten, so findet man kaum noch lebende Bakterienstäbchen. Aus Wochen oder Monate alten Röhrchen kann man zuweilen 100 Oesen untersuchen, ohne ein einziges Stäbchen zu finden. Streicht man aber aus demselben Material 100 Oesen auf einen geeigneten Nährboden aus (Fleischextrakt-Pepton-Agar oder Krebsagar), so erhält man ein dichtes Bakterienwachstum, genau so, wie wenn man aus einem dicht mit Bakterien besäten Bouillonröhrchen abgeimpft hätte. Die Bakterien müssen sich also in der Milch in mikroskopisch schwer erkennbarer, fein verteilter Form vorfinden. Ich nehme an, daß dieses Entwicklungsstadium den filtrierbaren Gonidien von Löhnis entspricht.

Impft man nun von einer solchen Milchkultur, die mindestens 3—5 Tage bei etwa 30° gehalten wurde, in eine Lösung, die 1 Proz. Malzextrakt und 1 Proz. Gelatine enthält (andere Nährlösungen sind weniger geeignet), so zeigt sich eine sehr merkwürdige, bisher noch niemals in so klarer Weise beobachtete Erscheinung. Es entstehen nach wenigen Stunden bei einer Temperatur von etwa 30—33° lange Stäbchen, welche die Länge der normalen, begeißelten *Tumefaciens*-Stäbchen beträchtlich übertreffen (s. Fig. 1, 4 und 5). Diese gramnegativen Stäbchen kopulieren nach etwa 10—15 Std. sternförmig, es vereinigen sich mit einem Ende 2, 3, 4 und mehr, oft über 100 Stäbchen, wobei sehr charakteristische Figuren entstehen (s. Fig. 4 und 5). Im Zentrum der Sterne bleibt stets ein freier, nicht färbbarer Raum.

Die Art der Weiterentwicklung der kopulierten Bakterien ist verschieden. Es wurden zunächst in kopuliertem Material bestimmt „Regenerativkörper“ beobachtet, das sind Kugeln von der etwa 2—3fachen Bakteriendicke. Der Inhalt der Kugeln bleibt bei der Färbung hell, bis auf einen, an einer Seite kurzen, stäbchenförmigen, meist etwas gekrümmten Körper, der die Farbe stark annimmt. Diese Regenerativkörper haben eine gewisse Ähnlichkeit mit dem Ringstadium der Malariaplasmodien. Zuweilen zerfallen die Kopulationssterne wieder in einzelne Bakterien, meistens beobachtet man aber, daß die Stäbchen undeutlich werden und sich in eine schleimige Masse umwandeln. Der Vorgang entspricht dann genau der von Löhnis beschriebenen Symplasmabildung (s. Fig. 6).

Sehr merkwürdig ist nun, daß die Bakterien sich nach der Kopulation anders verhalten als vorher. Alte *Tumefaciens*-Kulturen wachsen auf Krebsagar in Form dicker, schleimiger Massen, die sehr leicht zerteilbar sind und dem Nährboden lose aufliegen. Impft man kopulierte Kulturen auf denselben Nährboden, so werden die Kolonien viel fester, manchmal fast knorpelig, in vielen Fällen scheiden sie dann einen braunen Farbstoff aus, der vorher nicht zu beobachten war. Außerdem ist zweifellos eine Aenderung des Sauerstoffbedarfes wahrzunehmen. Die Bakterien wachsen nach der Kopulation teilweise in den Agar hinein, was vorher nicht der Fall ist.

Es ist noch nicht erwiesen, daß die Kopulation (nach Löhnis Konjunktion) der Bakterien ein der Kopulation anderer niederer Pflanzen gleichwertiger physiologischer Vorgang ist, nach allen meinen Beobachtungen ist es aber sehr wahrscheinlich, daß es sich dabei um einen Sexualakt handelt. Die Annahme, daß der Phytit nach der Kopulation in den Ascit übergeht, ist nahelegend, konnte aber bisher noch nicht exakt nachgewiesen werden. In einem

Falle, und zwar an dem menschenpathogenen Stamm, den ich von Herrn Geh. Rat Blumenthal erhalten hatte, zeigte sich mehrere Male nach der Kopulation in flüssigen Kulturen das Auftreten der grampositiven Form; später konnte ich diese Erscheinung aber weder bei demselben Stamm beobachten noch bei anderen, die sich längere Zeit in Kultur befanden.

Aus Krebstumoren isolierte Bakterien, die von dem *Tumefaciens*-Typ abweichen.

E. Smith war der erste, der das *Bacterium tumefaciens* aus Krebstumoren von Pflanzen isolierte; von Blumenthal, Auler und Meyer wurde es zuerst in Krebsgeschwülsten des Menschen gefunden. Später zeigte sich aber, daß aus Krebsgeschwülsten von Menschen und Tieren noch andere Bakterien isoliert werden konnten, mit deren Reinkulturen ebenfalls wieder echte Krebse erzeugt werden konnten.

In Deutschland teilten zuerst Binz und Räth (3) mit, daß sie aus Krebstumoren des Menschen grampositive Bazillen isoliert haben. An der Richtigkeit ihrer Befunde ist nicht zu zweifeln; leider sind ihre Mitteilungen so unvollständig, daß sie für eine genauere bakteriologische Beurteilung nicht in Betracht kommen. Ähnliche Befunde scheint 1921 Glover (8) gemacht zu haben. Er isolierte ebenfalls aus den verschiedensten Krebsgeschwülsten grampositive Bazillen, die nach Loudon und Cormack (14) auch Fäden bilden können. Ferner beschrieb Scott (20) ähnliche Organismen, die grampositive kettenbildende Bazillen darstellen und in gewissen Entwicklungsstadien filtrierbare Gonidien bilden. Es ist mir leider nicht möglich gewesen, die Originalarbeiten der genannten Autoren zu erhalten, die mir aus Referaten bekannten Angaben über ihre Befunde stimmen mit meinen Beobachtungen überein, wobei ich ausdrücklich bemerke, daß ich von den Arbeiten erst nach Abschluß meiner Untersuchungen bei der Zusammenstellung des Manuskriptes Kenntnis erhalten habe.

1918 entdeckte der Amerikaner Nuzum (15) in Krebstumoren des Menschen Streptokokken, die er für die alleinigen und echten Krebserreger hält. Seine Befunde wurden später von Ochsner (16) bestätigt. Auch diese Originalarbeiten standen mir nicht zur Verfügung; die mir bekannt gewordenen Befunde stimmen ebenfalls mit meinen Beobachtungen überein. Ich konnte die „Nuzum“-Streptokokken in allen Krebsgeschwülsten nachweisen.

Bei der Ablieferung des Manuskriptes der vorläufigen Mitteilung zu dieser Arbeit erhielt ich von Herrn Prof. Löhnis die hier besonders interessierenden Originalarbeiten von Young (25). Ich habe diese Arbeiten mit großem Interesse studiert, denn die Auffassungen von Young kommen, soweit ich die Literatur übersehen kann, meiner Ansicht von dem Wesen der Krebskrankheit am nächsten. Seine bakteriologischen Befunde bedürfen jedoch einer näheren Besprechung.

Young isolierte aus Krebsen von Menschen und Tieren verschiedene Bakterienformen, die er für Kreislaufformen (im Sinne von Löhnis) eines einzigen Organismus hält. Die wichtigste Wachstumsform, „the infective phase“, sollen nun, wie wiederholt betont wird, Bakterien der Coli-Typhus-Gruppe sein. Da man doch wohl kaum annehmen kann, daß ein Bakteriologe, der sich an eine derartige Aufgabe wagt, ein *B. coli* nicht von der grundverschiedenen *Fluorescens*-Gruppe (*Tumefaciens*-Gruppe) unterscheiden kann, so liegt die Vermutung nahe, daß er nicht mit reinem Material gearbeitet hat. Weder von mir noch von anderen Autoren wurden jemals Bakterien der Coli-Gruppe als Krebserreger festgestellt; sie sind aber, namentlich bei Leichen-

material, häufig in den Tumoren anzutreffen. Die Krebsbazillen haben eben gerade nicht „the biological characters of a bacillus coli“, wie Young angibt, die Gruppen sind morphologisch ohne weiteres auseinanderzuhalten und biologisch so verschieden, daß man z. B. beim Ausstreichen eines Gemisches der beiden Formen auf den von mir angegebenen Krebsagar die Fluoreszenten in Reinkultur isolieren kann. Die von Young beobachteten grampositiven Bakterien können sehr wohl echte Krebsbakterien gewesen sein; nach meinen Erfahrungen stellen z. B. seine Abbildungen Nr. 3, 4 und 5 (1921) den Erreger dar, bei den anderen Abbildungen ist eine Beurteilung schwer, da die angegebenen Entwicklungsstadien auch von anderen Bakterienarten gebildet werden können; sie sind für den Krebserreger nicht spezifisch. Daß die von Young abgebildeten dicken, verzweigten Pilzfäden zu den Kreislaufformen der von ihm beschriebenen Bakterien gehören, kann ich nicht annehmen.

Ich schließe aus dem Studium der Arbeiten von Young, daß die von ihm vertretene Auffassung von der Variabilität des Krebserregers richtig war: seine experimentell bakteriologische Bearbeitung der Frage erscheint mir aber nicht einwandfrei. Die Arbeiten von Young hätten trotzdem mehr Beachtung verdient, als sie bisher gefunden haben.

Es ergibt sich jedenfalls aus vorstehenden Angaben, daß von einer Anzahl verschiedener Forscher aus Krebsgeschwülsten von Menschen und Tieren verschieden gestaltete grampositive Bakterien isoliert wurden, die sich von *B. tumefaciens* wesentlich unterscheiden. Wie mit *B. tumefaciens*, konnten mit Reinkulturen dieser Bakterien echte Krebse bei Versuchstieren erzeugt werden. Alle die angegebenen Bakterienformen konnte ich aus Krebsgeschwülsten des Menschen selbst isolieren; es besteht kein Zweifel, daß die Angaben der erwähnten Forscher richtig sind.

Daß die verschiedenen beschriebenen grampositiven Krebsbakterien in bezug auf Größe und Gestalt sehr variabel sind, wurde von allen Beobachtern angegeben. Nach meinen Beobachtungen kann man die verschiedenen Formen durch Aenderung der Kulturbedingungen leicht ineinander überführen. Man kann zuweilen Kokken, Streptokokken und kürzere und längere Stäbchen in einem Präparate feststellen: es kommen sogar Ketten vor, die aus Kokken und Stäbchen zusammengesetzt sind. Es liegt kein Grund vor, anzunehmen, daß die verschiedenen grampositiven Formen des Krebserregers verschiedene „Arten“ sind. Schwieriger ist zu entscheiden, ob und inwieweit sie mit den gramnegativen Formen Beziehungen aufweisen. Man könnte annehmen, daß den jungen Kulturen, die immer allein virulent sind, vielleicht Gonidien der gramnegativen Form beigemischt sind. Einzelne meiner Beobachtungen deuteten darauf hin, daß vielleicht die Bastardierung bei der Erscheinung eine Rolle spielt. Schließlich kann es sich um Kreislaufformen (Zyklusformen im Sinne von Löhnis) handeln.

Nach allen meinen bisher durchgeführten Beobachtungen nehme ich das letztere an. Ich habe in vielen Fällen bemerkt, daß frisch isolierte gramnegative Stämme in die grampositive Form übergangen. Am besten beobachtet man die Umwandlung, wie folgt. Frisch isolierte, auf ihre Reinheit besonders geprüfte Kolonien impft man in Röhren, die etwa $\frac{3}{4}$ mit Milch gefüllt sind. Nach einer Kulturdauer von etwa 3—5 Tagen, nachdem die Milch koaguliert ist, gibt man von dieser aus den unteren Schichten, nicht von der Oberfläche, eine Platinöse voll in ein Röhren, das zur Hälfte mit einer Lösung von 1 Proz. Malzextrakt und 1 Proz. Gelatine gefüllt ist. Nach mehreren Tagen entwickeln sich dann die grampositiven Formen am Grunde des Röhrens in Form von Kettenkokken oder Kurzstäbchen. Für den auf diesem Gebiete nicht Geübten sei besonders hervorgehoben, daß sowohl Milch als Gelatinelösungen sehr

schwer zu sterilisieren sind. Ich verwendete zu den angegebenen Versuchen nur Nährböden, die mindestens 6mal im Dampf sterilisiert wurden und die sich dann nach mindestens 3 Wochen noch als keimfrei erwiesen. Es ist bei den Versuchen ausgeschossen, daß es sich etwa um Mischkulturen mit anderen grampositiven Bakterien gehandelt hat. Die grampositiven Krebsbakterien sind kulturell und morphologisch so gut charakterisiert, daß sie mit anderen etwa in Betracht kommenden Formen nicht verwechselt werden können. In einem Falle beobachtete ich, wie schon erwähnt, die beschriebene Umwandlung an einem älteren Stamm nach der Kopulation. Bemerkt sei noch, daß auch Young angibt, an Reinkulturen grampositiver Krebsbakterien gramnegative Entwicklungsstadien beobachtet zu haben. Während wir z. B. vom Milzbrandbazillus wissen, daß die grampositiven Kreislaufformen wesentlich beständiger und leichter kultivierbar sind als die gramnegativen, liegen die Verhältnisse beim Krebserreger umgekehrt.

Der letzte Beweis, daß es sich um Kreislaufformen handelt, wäre wohl dadurch zu erbringen, daß man jeden alten, echten Tumefaciens-Stamm in die grampositive Form überführen könnte. Ich konnte in dieser Richtung nur wenige Versuche anstellen, die ergebnislos verliefen. Es ist natürlich zweifelhaft, ob sich diese Umwandlung, die an frischen Stämmen beobachtet wurde, auch mit in Kultur befindlichen Stämmen, die lange Zeit rein vegetativ vermehrt wurden, überhaupt noch erreichen läßt. Man könnte einen solchen Stamm vielleicht mit einer lange Zeit rein vegetativ vermehrten Kulturpflanze (z. B. Banane) vergleichen, die auf dieselbe Weise ihren Generationswechsel verloren hat. Zur Entscheidung dieser Frage sind umfangreichere Versuche notwendig.¹

Wie isoliert man den Krebserreger?

Der Krebserreger ist im befallenen Gewebe von Menschen, Tieren und Pflanzen normalerweise nicht in Form von Bakterienstäbchen oder von Kokken enthalten, sondern in mikroskopisch schwer oder nicht erkennbarer Form. Je nach der von den verschiedenen Autoren angewendeten Kulturmethode treten dann die Bakterien in Form von gramnegativen oder grampositiven sehr verschieden gestalteten Bakterien in Erscheinung.

Die große Schwierigkeit in der Isolierung der Krebsbakterien lag bisher darin, daß es nicht möglich war, diese von anderen als Verunreinigung auftretenden Bakterien zu unterscheiden und zu trennen. Die oben angegebene Kaliumnitrat-Glyzerinlösung (Krebslösung) und der damit hergestellte Agar bilden nun vorzügliche Hilfsmittel bei der Isolierung. Ich gebe im folgenden eine kurze Beschreibung der von mir immer mit gutem Erfolge angewendeten Methode; es gelang mir, selbst bei mehrere Tage altem Leichenmaterial regelmäßig und mit Sicherheit die Krebsbakterien zu isolieren. Selbstverständlich spielt auch hierbei, wie in allen Fällen, die Uebung eine gewisse Rolle; die Isolierung macht aber bei Befolgung der beschriebenen Methode keinerlei Schwierigkeiten.

Von dem Tumormaterial nimmt man naturgemäß am besten noch feste, speckige Stücke, die noch frische, nicht zerfallene Krebszellen enthalten. Ich habe aber auch ältere, schon teilweise zerfallene Krebse meist mit Erfolg verwendet. Man kultiviert immer eine größere Anzahl von Proben nebeneinander auf festen und flüssigen Substraten.

1) Kultur in Krebslösung: Man schneidet von dem Tumormaterial etwa hirsekorngroße bis höchstens erbsengroße Stücke heraus und bringt sie mit einer sterilen Pinzette in Reagenzröhrchen, die mindestens bis zur Hälfte

mit Krebslösung gefüllt sind. Nimmt man größere Gewebsstücke, so wird selbstverständlich durch den herausdiffundierenden Zellsaft der Charakter der Nährlösung verändert; die Folge davon ist, daß ihre hohe Selektivität verloren geht. Die Kulturen bleiben 1—5 Tage im Brutschrank bei 30 bis 33°. Hierauf nimmt man aus dem Röhrchen eine Platinöse voll und stellt damit (eventuell noch verschieden verdünnte) Schüttelkulturen in Krebsagar her. Auf erstarrte Krebsagarplatten muß man außerdem noch einige Oesen auf der Oberfläche austreichen: das Material entwickelt sich hier meist besser als in Schüttelkulturen.

Enthält die Lösung bei mikroskopischer Untersuchung sehr wenig oder keine Bakterien, was verhältnismäßig selten vorkommt, so ergreift man das am Grunde des Röhrchens liegende Gewebsstück mit einer sterilen Pinzette und streicht es leicht und schnell über die Oberfläche einer Krebsagarplatte. Die anhaftende Nährlösung muß vorher gut abgetropft sein; die Oberfläche des Agars darf kein Kondenswasser ziehen. Nur bei richtigem Austreichen erhält man weit auseinanderliegende Einzelkolonien, die allein die Isolierung ermöglichen.

2) Kultur in Krebsagar: Man zerdrückt kleine Teilchen von frischem Tumormaterial und stellt damit fraktionierte Krebsagargußplatten her. Ferner nimmt man ein etwa erbsengroßes Stück des frischen Tumors und streicht damit über die Oberfläche einer erstarrten Krebsagarplatte, wie das mit dem Material aus der Nährlösung beschrieben wurde.

Die auf die vorstehend beschriebene Weise hergestellten Agarplatten werden sämtlich im Brutschrank bei 30—33° kultiviert; etwas höhere und niedrigere Temperaturen verhindern nicht das Wachstum; es empfiehlt sich aber, wenn möglich, die angegebenen Optimaltemperaturen einzuhalten. Die Oberfläche der Agarplatten muß während der Kulturdauer trocken sein, da sonst Einzelkolonien nicht zu erhalten sind.

Erkennung der Kolonien: Nach einiger Uebung lassen sich die Kolonien des Krebserreger nach 24—48 Std. (bei Schüttelkulturen in 3—8 Tagen) auf den angegebenen Agarplatten leicht erkennen. Verwendet man Material, das nicht mit Bakterien der *Fluorescens*-Gruppe verunreinigt ist, und das ist fast bei jedem frischen, noch nicht zerfallenem Tumormaterial der Fall, so erhält man den Erreger vielfach ohne weiteres in Reinkultur. Die Kolonien sind sehr klein, oft mit bloßem Auge kaum erkennbar; sie sind wenig erhaben und wasserhell. Im mikroskopischen Bilde zeigen sich plumpe gramnegative Kurzstäbchen von etwa 1 μ Länge und 0,6 μ Breite; charakteristisch ist, daß in den Kolonien zuweilen vereinzelt etwas dickere und oft viel längere Stäbchen vorkommen, die dem auf dem Gebiete nicht Erfahrenen Verunreinigungen vortäuschen können. Nach häufigem Ueberimpfen auf Fleischextrakt-Pepton-Agar werden die Stäbchen dünner und länger, die abweichenden Formen verschwinden, man erhält die typische *Tumefaciens*-Form, wie sie in vielen Laboratorien in Stämmen verschiedenster, meist pflanzlicher Herkunft dauernd kultiviert werden.

Der angegebene Krebsagar schaltet selbst bei stark verunreinigtem Impfmateriale alle fremden Keime sofort oder nach mehrmaligem Ueimpfen aus, sofern es sich nicht um Vertreter der *Fluorescens*-Gruppe handelt. Diese, namentlich in Leichenmaterial häufigen Bakterien wachsen auf den angegebenen Nährböden wesentlich schneller und üppiger, die Kolonien sind dicker, milchiger und schleimiger, die Stäbchen viel dicker und plumper. Auch der Ungeübte kann beide Formen leicht unterscheiden, wenn er auf einer Krebsagarplatte nebeneinander Striche der beiden Formen aufbringt. Die nicht als Erreger in Betracht kommenden Fluoreszenten wachsen sehr rasch in dicken, er-

haben, zuweilen auslaufenden oder sich verästelt ausbreitenden Strichen; der Erreger bildet kaum erhabene, wasserhelle, oft nur hauchförmig dünne Beläge. Nach längerer Kulturdauer wird auch das Wachstum der Krebsbakterien üppiger.

Zur Weiterkultur der isolierten Reinkulturen verwendet man am besten Fleischextrakt-Pepton-Agar. Einzelne, selten vorkommende Stämme des Krebserreger zeigen in Kulturen mehr oder weniger deutliche gelbgrüne Fluoreszenz; auf Krebsagar wird oft, besonders von frisch kopulierten Stämmen, ein brauner Farbstoff ausgeschieden. Manche Stämme lassen sich sehr leicht weiterkultivieren, andere wachsen anfangs sehr schlecht und müssen alle 3—5 Tage umgeimpft werden.

Nach vorstehender Kulturmethode gelingt es in gleicher Weise auch aus Pflanzentumoren den Krebserreger zu isolieren; man verwendet dann am besten mit einem sterilen Messer aus dem Inneren der Geschwulst herausgeschabtes Gewebe. Ich konnte mit gleich gutem Erfolge auch getrocknetes und monatelang aufbewahrtes Tumorgewebe von Menschen, Tieren und Pflanzen verwenden. Bei Pflanzen gelingt die Kultur dann meist nur, wenn die getrockneten Tumoren sich im Freien an den Pflanzen befanden; bei längerem Aufbewahren in trockener Zimmerluft wird der Erreger abgetötet.

Nach der beschriebenen Anweisung erhält man den Krebserreger meist in der Tumefaciens-Form. Die direkte Isolierung der grampositiven Formen ist namentlich bei stark verunreinigtem Ausgangsmaterial schwieriger. Die grampositiven Stämme lassen sich zuweilen nur schwer auf Agarnährböden weiterkultivieren; sie gehen manchmal nach kurzer Zeit ein. — Für meine Kulturversuche standen mir außer zahlreichen Pflanzentumoren 15 Fälle von Krebsgeschwülsten des Menschen zur Verfügung, und zwar hatte sich der Tumor gebildet 5mal in der Leber, 4mal in der Mamma, 3mal im Magen, je 1mal in Lunge, Uterus und Rectum. Es handelte sich in den meisten Fällen um Leichenmaterial, nur 2mal erhielt ich frisches Operationsmaterial. In allen Fällen gelang die Isolierung des Erregers auf die angegebene Weise.

Abweichende Befunde wurden in verschiedenen Fällen an Rattentumoren mit genau bekannten Erregern gemacht, die sich leicht aufklären ließen und die für die Isolierung der Krebsbakterien von allgemeinem Interesse sind. In einem Falle entwickelten sich in der mit Tumormaterial beschickten Krebslösung keine Erreger; es ergab sich, daß die betreffenden Röhrchen einen für den in Betracht kommenden Stamm stark wirksamen Bakteriophagen enthielten. In einem anderen Falle entwickelten sich in der Kultur Staphylokokken, die auf die Krebsbakterien eine sehr starke antagonistische Wirkung ausübten. Die Staphylokokken, auf dicht mit Krebsbakterien besäte Agarplatten ausgestrichen, erzeugten um den Impfstrich einen weiten, sterilen Hof (siehe Fig. 13). Diese beiden Fälle müssen bei der Isolierung des Krebserreger besonders beachtet werden, da auf diese Weise die Entwicklung der Kultur verhindert werden kann. Man dürfte nach meinen Erfahrungen die angedeuteten Mißerfolge meist vermeiden können, wenn man dem Tumor möglichst viele, von verschiedenen Stellen stammende Proben entnimmt.

Die filtrierbare Form des Krebserregers.

Nachdem zuerst von Löhnis gezeigt wurde, daß es eine allgemeine Eigenschaft der Bakterien ist, filtrierbare Gonidien zu bilden, ist von vornherein zu erwarten, daß auch die Krebsbakterien diese Eigenschaft annehmen können.

Es liegt jedenfalls kein Grund vor, anzunehmen, daß gerade diese Organismen eine Ausnahme machen sollten. — Wie bereits beschrieben wurde, vermehrt sich die Tumefaciens-Form des Krebserregers in steriler Milch nur sehr wenig oder gar nicht, sondern es werden darin Gonidien gebildet. Mikroskopisch sind dieselben nicht festzustellen, da die Milch normalerweise eine feinkörnige Struktur besitzt; man kann in Milch nicht feststellen, ob die Gonidien mikroskopisch überhaupt erkennbar sind. Filterversuche mit Milch sind schwer durchzuführen, da diese sofort die Poren verstopft. Ich konnte wenigstens eine geringe Menge Filtrat erhalten, wenn ich die Filter vor dem Gebrauch mit sterilem Wasser tränkte und die Milch vor dem Absaugen etwa 1—2 Std. in der Kerze stehen ließ. Das Filtrat erwies sich in den meisten Fällen als steril. Weit bessere Ergebnisse erzielt man, wenn man mehrere Wochen alte Bouillonkulturen verwendet. Diese werden vor dem Filtrieren zur Hälfte mit sterilem Wasser verdünnt; sie gehen verhältnismäßig leicht durch die Filter; das bakterienfreie Filtrat bildet in Nährlösungen, schwieriger auf Nähragar, fast immer wieder neue Bakterien. Ich verwendete für die Versuche Berkefeld-Kerzen, die sich für Untersuchungen über das d'Herellesche Phänomen als sehr brauchbar erwiesen hatten. Selbstverständlich wurden die Filter vor jedem Versuch mit einer Aufschwemmung frischer Tumefaciens-Bakterien auf ihre Undurchlässigkeit für Bakterien geprüft.

Die Versuche ergaben jedenfalls, daß die Krebsbakterien ein filtrierbares Entwicklungsstadium besitzen, wie das auch bei anderen Bakterien beobachtet wurde. Die Frage, ob diese filtrierbare Form mit dem ebenfalls filtrierbaren Entwicklungsstadium, das in den Krebsgeschwülsten vorliegt, identisch ist, bedarf weiterer Untersuchungen.

Sind die Krebskrankheiten bei Menschen, Tieren und Pflanzen gleiche oder verschiedene Erscheinungen?

Die Annahme, daß die Krebskrankheiten (in erster Linie Karzinome und Sarkome) bei Menschen von denen der Tiere prinzipiell verschieden seien, wurde bisher wohl kaum ernstlich vertreten. Es gelingt zwar im allgemeinen nicht, Krebstumoren vom Menschen auf Tiere zu übertragen; in einzelnen Fällen scheint dies aber doch einwandfrei gelungen zu sein. Im übrigen sind aber die Krankheitserscheinungen so übereinstimmend, daß von grundlegenden Unterschieden wohl kaum die Rede sein kann.

Ganz anders sind die Ansichten über den Tumefaciens-Krebs der Pflanzen. Von fast allen Medizinern und Botanikern, die sich mit der Frage befaßt haben, wird angegeben, daß Tier- und Pflanzenkrebs wesentlich verschiedene Erscheinungen sind. Als grundlegender Unterschied wird angegeben, daß bei Pflanzen keine Sekundärtumoren (Metastasen) vorkommen, daß das Tumorstadium nicht genau wie bei den Tieren „infiltrierend“ ist, und daß die Form der Tumorzellen sich bei Pflanzen nach Uebertragungen nicht in gleicher unveränderter Weise weiter entwickelt, wie das bei Menschen und Tieren der Fall ist.

Die verbreitete Angabe, daß bei Pflanzen keine Sekundärtumoren vorkommen, beruht auf ungenügender Beobachtung. Sowohl von mir als auch von anderen Forschern wurden bei bestimmter Kultur der Versuchspflanzen Sekundärtumoren festgestellt, die nicht auf das Vorhandensein von „tumorständen“ zurückzuführen sind. Daß diese Sekundärtumoren in gleicher Weise wie bei Menschen und Tieren, d. h. durch Verschleppung von Tumorzellen, entstanden sind, ist zweifelhaft, da, wie bereits näher ausgeführt wurde, in der Pflanze Leitungsbahnen, die den Verschleppungswegen bei Menschen und

Tieren entsprechen, gar nicht vorhanden sind. Die Möglichkeit, daß feinste Tumorteilchen auch in der Pflanze von Zelle zu Zelle, vielleicht durch die Plasmodesmen, wandern können, ist aber ohne genauere Untersuchung jedenfalls nicht zu widerlegen. Die Annahme, daß Pflanzenkrebs und Tierkrebs sich wesentlich durch das Fehlen von Sekundärtumoren bei Pflanzen unterscheiden, ist unbegründet.

Ueberträgt man frischen, im Mörser zerstampften Brei einer Krebsgeschwulst einer Ratte, die aus langen, spindelförmigen Zellen besteht (Spindelzellensarkom), auf eine andere Ratte, so entsteht normalerweise wieder ein ganz gleich gebautes Spindelzellensarkom; überträgt man in gleicher Weise ein rundzelliges Karzinom, so entsteht wieder ein Karzinom, ganz gleich, an welcher Körperstelle die Uebertragung erfolgte und wie die umliegenden Zellen gebaut sind. In gleicher Weise verhalten sich die natürlichen Sekundärtumoren (Metastasen); die Zellform des Primärtumors bleibt an allen Stellen erhalten.

Bei Pflanzen liegen die entsprechenden Verhältnisse anders, die Zellform des Gewebes, aus dem der Tumor ursprünglich entstanden ist, bleibt nicht erhalten. Diese Tatsache gilt als wesentlicher, grundlegender Unterschied zwischen Tier- und Pflanzenkrebs. In Wirklichkeit besteht zwischen den Krankheitserscheinungen gar kein Unterschied; die beobachteten Abweichungen beziehen sich lediglich auf das prinzipiell verschiedene physiologische Verhalten der Tier- und Pflanzenzelle.

Die einzelnen Zellen höherer Tiere und der Menschen sind so weitgehend differenziert, daß sie bei der Reproduktion im allgemeinen immer wieder nur denselben Zelltyp bilden können, d. h. aus runden Zellen werden wieder runde, aus spindelförmigen wieder spindelförmige Zellen. Aus einer Gehirnzelle kann keine Muskelfaser werden und umgekehrt. Noch viel weniger kann man aus einer einzelnen Zelle einen ganzen Organismus regenerieren; aus einem Stückchen Haut eines Menschen kann man keinen neuen Menschen machen. Bei Pflanzen dagegen gelingt dieses Experiment sehr leicht. Man kann z. B. aus einer einzigen Epidermiszelle einer Begonie eine vollständige neue Pflanze erzeugen; aus der einen parenchymatischen Hautzelle entstehen keineswegs nur lauter Parenchymzellen, sondern jede nur denkbare Zellform und jedes Gewebe kann sich daraus regenerieren.

In Fig. 14 ist ein Blattstiel von *Solanum nigrum macrocarpum* abgebildet, dessen Epidermis durch Anstechen mit einer sehr feinen Nadel mit *B. tumefaciens* geimpft wurde. Aus den Epidermiszellen, die parenchymatisch sind, entwickelte sich ein Krebstumor, der anfangs, wie jeder Pflanzenkrebs, aus mehr oder weniger langgestreckten Zellen bestand. Nach einiger Zeit entstand auf der Oberseite des Tumors ein Vegetationspunkt; aus den Tumorzellen (nicht etwa aus normaler Epidermis) entwickelte sich eine vollständige neue, gesunde Pflanze, die leicht zur Bewurzelung und Fortpflanzung gebracht werden konnte. Ich habe diesen Versuch noch mit verschiedenen anderen Solanaceen mit gleichem Erfolge wiederholt. Fig. 16 zeigt eine Krebsgeschwulst von *Datura Metel*, in der sich alle nur denkbaren Zellformen nachweisen ließen. Der Tumor in Fig. 15 besteht in der Hauptsache aus Parenchymgewebe.

Die Annahme, daß sich die Krebskrankheit bei Menschen, Tieren und Pflanzen dadurch unterscheidet, daß beim Pflanzenkrebs die ursprüngliche Zellform nicht erhalten bleibt, entbehrt jeder Begründung. Der Unterschied besteht lediglich darin, daß die weitgehend differenzierte Zelle des Menschen und der Tiere normalerweise wieder denselben Zelltyp bildet, während die teilungsfähige Pflanzenzelle, und zwar die normale ebenso wie die Krebszelle, jede andere Zellform erzeugen kann.

Auch der Unterschied, der in dem „infiltrierenden Wachstum“ der Krebszellen vorhanden sein soll, ist lediglich auf die verschiedene Natur der Organismen zurückzuführen. Daß ein entstehender Pflanzenkrebs nicht zwischen die fest verbundenen, durch eine starre Zellulosemembran abgeschlossenen oft sogar verholzten Zellen eindringen kann, ist ohne weiteres ersichtlich. Die Tumoren drängen das gesunde Gewebe beiseite, genau so wie das z. B. an Adventivsprossen oder Adventivwurzeln beobachtet werden kann.

Die eingangs erwähnten Unterschiede zwischen Tier- und Menschenkrebs einerseits und Pflanzenkrebs andererseits sind nicht durch einen Unterschied der Krankheit begründet, sondern durch die morphologische und physiologische Verschiedenheit der Organismen. Die Krebskrankheiten bei Menschen, Tieren und Pflanzen sind identisch.

Gibt es einen oder mehrere verschiedene Krebserreger?

Von Gegnern der Infektionstheorie wird angegeben, daß es mit den experimentell festgestellten Tatsachen in Widerspruch stehe, wenn man annehmen würde, daß die verschiedenen Formen der Krebskrankheit durch einen einzigen Erreger hervorgerufen werden. Es ist, wie bereits ausgeführt wurde, eine allgemein bekannte Tatsache, daß der morphologische Charakter einer Geschwulst bei der Uebertragung im allgemeinen erhalten bleibt, d. h. es entsteht z. B. aus einem Sarkom immer wieder ein Sarkom und aus einem Karzinom ein Karzinom. Diese Erscheinung trifft zwar in der Regel zu, es wurden aber in einzelnen Fällen auch sicher Umwandlungen der Geschwulstform beobachtet. Muß nun aus der Tatsache, daß der Geschwulstcharakter im allgemeinen erhalten bleibt, geschlossen werden, daß die verschiedenen Geschwülste verschiedene Erreger haben? Das ist bestimmt nicht der Fall. Der Charakter der Geschwulst wird bei Menschen und Tieren durch den Ort der ursprünglichen Infektion bedingt. Bei der Uebertragung und bei der Metastasenbildung wird nicht der Erreger, sondern die infizierte Zelle oder Zellbestandteile mit dem Erreger übertragen. Die übertragene Zelle bestimmt die Zellform des sich entwickelnden Tumors, nicht der Erreger. Mit Reinkulturen des Erregers kann man je nach der angewendeten Impftechnik verschieden gestaltete Geschwülste erhalten. Der verschiedene morphologische Charakter der Geschwülste ist bestimmt nicht durch eine Verschiedenheit des Erregers bedingt.

Am einfachsten läßt sich die Gleichheit der Erreger durch Isolierung der Bakterien aus den Geschwülsten nachweisen. Ich habe keinen Fall feststellen können, und auch aus der Literatur ist mir kein Fall bekannt geworden, bei dem man mit Sicherheit einen Erreger hätte nachweisen können, der nicht in die beschriebene Bakteriengruppe gehört. Daß die einzelnen Vertreter dieser Gruppe innerhalb einer bestimmten Variationsbreite gewisse Abweichungen, die nicht konstant sind, aufweisen, wurde bereits ausgeführt.

Daß der Krebserreger bei Menschen, Tieren und Pflanzen identisch ist, wurde zuerst von Blumenthal und später von Kauffmann dadurch bewiesen, daß man mit ein und demselben Bakterienstamm sowohl bei Tieren als auch bei Pflanzen Krebse erzeugen kann. Es ist mir ebenfalls gelungen, mit einem aus einem Mammakarzinom isolierten Stamm bei Pflanzen echten Krebs herzustellen (s. Fig. 12). Ferner konnte ich mit einer Reinkultur eines aus einem Pflanzentumor isolierten Stammes bei einer Maus nach der später beschriebenen Methode eine etwa kirschengroße Geschwulst von Sarkomcharakter erzeugen. Meine eigenen Versuche beziehen sich auf die Untersuchung von Karzinomen und Sarkomen. Daß einzelne von diesen Typen abweichende seltenere Krebsformen bei Menschen und Tieren einen anderen Erreger haben können, ist

natürlich denkbar und wäre noch zu untersuchen; jedenfalls liegt aber bisher hierfür keinerlei Anhaltspunkt vor.

Es ergibt sich daher, daß die Krebskrankheit durch einen einheitlichen Erreger verursacht wird; für die Annahme, daß verschiedene Erreger oder andere Ursachen in Betracht kämen, liegt kein Grund vor.

Wie erfolgt die Infektion bei Menschen, Tieren und Pflanzen?

Ueber den Vorgang der natürlichen Infektion bei Pflanzen ist so gut wie nichts bekannt. Beim Krebs der Weinreben weiß man z. B., daß nach Frost und Hagelschlägen ein gehäuftes Auftreten der Krankheit erfolgt. Virulente Krebsbakterien, auf die Oberfläche gesunder, unverletzter Pflanzen gebracht, verursachen niemals Krebs. Wir wissen auch, daß bei Menschen und Tieren die Krebskrankheit vornehmlich dann auftritt, wenn die betreffenden Körperstellen durch Reize irgendwelcher Art geschwächt wurden.

Experimentell gelingt es, durch Einimpfen von virulenten Krebsbakterien in gesundes Gewebe bei Tieren und Pflanzen echten Krebs zu erzeugen. In den weitaus meisten Fällen gelingt die Infektion aber nicht, weil die zum Impfen benutzten, zweifellos echten Stämme nicht „virulent“ sind. Wir wissen seit langem, daß die meisten pflanzenpathogenen Stämme in mehr oder weniger kurzer Zeit die Fähigkeit, Tumoren zu bilden, verlieren. Die aus Krebsen von Menschen und Tieren gewonnenen Stämme verlieren die Virulenz meist noch viel schneller. In der überwiegenden Zahl aller Fälle läßt sich eine Infektion mit den zweifellos echten, frisch aus Tumoren von Menschen, Tieren oder Pflanzen isolierten Stämmen schon unmittelbar nach der Isolierung nicht erreichen.

Die außerordentlich wichtige Frage, was der Virulenzfaktor eigentlich ist, ist beim Krebs ebenso wie bei allen anderen Infektionskrankheiten bisher noch ganz unbekannt; es liegen noch nicht die geringsten Anhaltspunkte für die Lösung dieses Problems vor. Ich nahm ursprünglich an, daß diese Frage nur auf rein physiologischem Gebiete zu lösen sei; im Laufe der letzten Jahre habe ich aber durch zahlreiche Beobachtungen die Vermutung gewonnen, daß es sich vielleicht gar nicht um ein physiologisches, sondern um eine botanisch-morphologische Problem handelt. Es wäre möglich, daß nur bestimmte Entwicklungsstadien der Bakterien zur Infektion geeignet sind. Leider war ich gezwungen, weitere Untersuchungen auf diesem, mich ganz besonders interessierendem Gebiete abubrechen.

Wir wissen aus zahlreichen exakt beobachteten Beispielen, daß virulente Krebsbakterien ihre Virulenz sehr leicht verlieren, daß umgekehrt unter gewissen Bedingungen nicht virulente Formen pathogen werden müssen, erscheint mir daher selbstverständlich. Näheres über diesen Vorgang konnte bisher nicht festgestellt werden.

In bezug auf das physiologische Verhalten des Erregers ähnelt der Krebs auffällig der Aktinomykose. Die in der Natur weit verbreiteten Strahlenpilze sind in der Regel nicht pathogen. Unter gewissen Bedingungen, z. B. beim Einstechen von Getreidegrannen in die Zunge von Haustieren, erfolgt die Infektion. Die ursprünglich aëroben langfädigen Strahlenpilze werden nun im Tierkörper kurzfädig bzw. stäbchenförmig, das Sauerstoffmaximum nimmt stark ab. Auch der Krebserreger dürfte in der Natur als harmloser Saprophyt weit verbreitet sein; nur unter bestimmten Voraussetzungen (Schwächung des Gewebes durch Reize usw.) wird er virulent; auch bei ihm vermindert sich im befallenen Gewebe der morphologische Charakter und das Sauerstoffmaximum.

Ich habe im Laufe der letzten Jahre Krebstumoren an mehreren Hunderten von Pflanzen erzeugt. Zur Untersuchung der Krebskrankheit bei Tieren arbeitete ich hauptsächlich mit Ratten, Mäuse wurden nur zu Vergleichsversuchen angewendet.

Ueberträgt man Brei von frischen, lebenden Tumoren auf Tiere, so zeigt sich, daß immer eine bestimmte, verhältnismäßig große Menge der Substanz zur Uebertragung verwendet werden muß; nimmt man eine zu geringe Dosis, so erfolgt keine Tumorneubildung. Es gelang mir nun leicht, mit unterminimalen Dosen Tumorwachstum zu erzeugen, wenn ich gleichzeitig mit dem Tumorbrei etwas frischen Brei von Muskelgewebe eines gesunden Tieres einspritzte. Auch die Infektion mit virulenten Krebsbakterien gelang auf diese Weise viel leichter als mit reiner Bakterienaufschwemmung. Ich nehme an, daß die mit dem Erreger gleichzeitig eingespritzten lebenden Gewebelemente den Bakterien selbst Gelegenheit zur Bildung von Tumorzellen geben. Sie stellen gewissermaßen das geschwächte Gewebe dar, das bei der natürlichen Infektion durch verschiedenartigste Reize erzeugt wird. Auffällig ist, daß ich bei dieser Versuchsanordnung bei Ratten und Mäusen immer nur Sarkome erhielt; eine Karzinombildung, wie sie von anderen Forschern nach Einimpfen von Bakterienkulturen erhalten wurde, habe ich bisher nicht beobachtet.

Ich hoffe, später noch in der Lage zu sein, über die zurzeit noch laufenden Tierversuche zu berichten. Die von mir als Hauptaufgabe betrachteten Untersuchungen, nämlich die Herstellung von Krebstumoren durch Bakterien, die nicht aus Krebsgeschwülsten von Menschen, Tieren oder Pflanzen stammten, mußte ich nach guten Anfangserfolgen teilweise einstellen, teilweise sind sie noch nicht abgeschlossen.

Die grundlegende Frage, in welcher Weise die Infektion bei der Krebskrankheit erfolgt, d. h. insbesondere was die virulenten Krebsbakterien von den nichtvirulenten unterscheidet, konnte nicht gelöst werden, sie ist ja wohl auch für alle anderen Infektionskrankheiten noch ungelöst.

Vorkommen und Verbreitung des Krebserregers.

„Die Notwendigkeit der Annahme der Ubiquität der Krebserreger scheint uns als eine sehr gewagte Verlegenheitshypothese der beste Beweis für die Schwäche der Infektionstheorie“, schreibt ein bekannter Krebsforscher in einer gegen die Infektionstheorie gerichteten Arbeit. Wenn der Krebs eine echte Infektionskrankheit ist, muß der Erreger in der Tat sehr weit verbreitet sein. Es ist eine allgemein bekannte Tatsache, daß z. B. ein echtes Karzinom leicht entstehen kann durch einen Schlag oder Druck auf die weibliche Mamma, ohne daß dabei eine äußere Verletzung entsteht. Man muß also wohl annehmen, daß der Erreger in dem gesunden Mammagewebe vorhanden gewesen ist, oder daß er nach erfolgtem Reiz vielleicht auf den Blut- oder Lymphbahnen eingedrungen ist. Ganz ähnliche Fälle sind aber auch z. B. bei der Aktinomykose oder Tuberkulose bekannt. Wenn man seine Verwunderung über die weite Verbreitung eines Krankheitserregers aussprechen wollte, so könnte das mit größerem Recht für andere Erreger gelten, z. B. für den Tuberkelbazillus. Für diesen ist exakt nachgewiesen, daß er sich außerhalb des Organismus nur kurze Zeit lebend und virulent erhält, eine Vermehrung unter natürlichen Verhältnissen in Wasser, Erde oder an anderen Bakterienstandorten ist ausgeschlossen. Echte, aus Krebstumoren isolierte Krebsbakterien dagegen vermehren sich unbegrenzt an allen Orten, an denen Bakterien überhaupt gedeihen können. Ihre Widerstandsfähigkeit gegen Austrocknen und andere

Einflüsse, die für die Verbreitung in Frage kommen, ist zweifellos größer als die des Tuberkelerregers.

Umfangreiche, von mir durchgeführte Kulturversuche haben ergeben, daß Bakterien, die wir weder morphologisch noch kulturell von den aus Krebstumoren isolierten unterscheiden können, in der Natur überall sehr weit verbreitet sind. Ich konnte sie in vielen Stämmen kultivieren, besonders aus Erde und Wasser, sowie beinahe von allen Orten, an denen Bakterien überhaupt gedeihen können. Selbstverständlich ist es ohne umfangreiche Untersuchungen nicht möglich, zu sagen, ob alle diese Formen nun auch wirklich echten Krebs erzeugen können, genau so wenig, wie man von den zahllosen Strahlenpilzformen sagen kann, welche Stämme eine Aktinomykose hervorrufen können und welche nicht. Es ist vielleicht möglich, daß man später mit fortgeschrittener Technik noch weitere Differenzierungen erreichen kann; zurzeit sind wir jedenfalls nicht in der Lage, viele in der Natur weit verbreitete Bakterienstämme von den aus Krebsgeschwülsten von Menschen, Tieren und Pflanzen zu unterscheiden. Daß weder die Pathogenität noch serologische Reaktionen brauchbare Anhaltspunkte bieten, wurde bereits ausgeführt.

Aus zahlreichen klinischen Beobachtungen und Tierversuchen muß angenommen werden, daß der Krebserreger auch häufig im Körper von gesunden Menschen und Tieren vorhanden ist. Die Annahme, daß der gesunde Körper (mit Ausnahme der nach außen offenen Wege, besonders des Magen-Darmkanals) steril ist, bildet eine der Hauptgrundlagen für alle Untersuchungen auf dem Gebiete der Infektionskrankheiten. In Wirklichkeit ist der gesunde Körper aber nicht steril. Die Tatsache, daß man bei mikroskopischer Untersuchung in den Geweben von Menschen und Tieren keine Bakterien beobachten kann, schließt keineswegs aus, daß sie welche enthalten. Man hat wohl zuerst an Krebsgewebe von Pflanzen exakt nachweisen können, daß der Erreger in den Zellen vorhanden ist, ohne mikroskopisch erkennbar zu sein. In gleicher Weise trifft das für die Tumoren bei Menschen und Tieren zu. Aber auch für gesundes Gewebe liegen die gleichen Beobachtungen vor.

Die Franzosen Bertrand (2), Galippe (7) und Portier (17) berichten übereinstimmend, daß sie aus gesundem Gewebe von Säugetieren und Vögeln, besonders aus Hoden, Ovarien und Pankreas, regelmäßig bestimmte Bakterien kultivieren konnten, die nach ihren Beschreibungen den grampositiven Formen des Krebserregers ähnlich sind. Es liegt kein Grund vor, an der Richtigkeit ihrer Angaben zu zweifeln. Portier entwickelt nun auf Grund dieser Befunde die interessante Theorie, daß jede normale Zelle in Symbiose mit Bakterien lebt, die er mikroskopisch als Mitochondrien zu erkennen glaubt. Die Krebskrankheit beruht nach seinen Ausführungen auf einer Störung des Gleichgewichtes dieser Symbiose; die geschwächte Zelle ist nicht mehr in der Lage, die physiologischen Wirkungen des Bakteriums auszugleichen. Ich habe diese Theorie vor Jahren, als ich mich noch nicht experimentell mit dem Krebsproblem befaßt hatte, als geistreiche, aber phantastische Ansicht zitiert. Ich habe heute die Ueberzeugung gewonnen, daß sie mehr als viele andere heute herrschende Krebstheorien eine exakte Nachprüfung verdient. Ich glaube nicht, daß man die Mitochondrien einfach mit symbiontischen Bakterien identifizieren kann, daß aber der Krebsbazillus regelmäßig oder unter gewissen Bedingungen in der gesunden Zelle leben kann, und daß er nach Schwächung der physiologischen Leistungsfähigkeit der Zelle die Krebskrankheit verursachen kann, ist mir durchaus wahrscheinlich.

In diesem Zusammenhange brachten Nachuntersuchungen der bekannten Arbeiten Fibigers (6), dem es gelang, durch Verfütterung von Schaben echte Krebse bei Ratten zu erzeugen, eine große Ueberraschung. Die Schaben,

namentlich die große *Periplaneta americana*, enthalten zuweilen in ihrem Muskelgewebe Nematoden (*Spiroptera neoplastica*). Diese dringen bei der Verfütterung in das Gewebe der Ratten, besonders in Zunge und Magen ein und verursachen zweifellos echte, übertragbare und Metastasen bildende Krebsgeschwülste. Ich erhielt durch die Freundlichkeit der Direktion des Zoologischen Gartens in Berlin aus dem dortigen Aquarium eine große Anzahl der amerikanischen Schaben, in denen ich auch die *Spiroptera* nachweisen konnte. Kulturversuche mit Muskel- und Fettgewebe dieser Tiere ergaben die gänzlich unerwartete Tatsache, daß namentlich das Fettgewebe in den meisten Fällen vollgepfropft ist mit Bakterien der *Fluorescens*-Gruppe, die von den aus Krebsgeschwülsten isolierten Formen zum Teil nicht unterscheidbar sind. Bekannt ist seit langem, daß verschiedene Schabenarten in den Fettkörpern regelmäßig große, grampositive Symbiosebakterien beherbergen, die als *Bacillus cuenoti* bezeichnet wurden. Streicht man einen Teil eines Fettkörpers auf einem Objektglas aus und färbt das Präparat nach Gram, so sieht man regelmäßig die großen, meist gekrümmten Bazillen, andere Bakterien sind aber auch bei genauem Durchsuchen des Präparates nicht zu beobachten. Streicht man aber ein gleiches Stück eines Fettkörpers auf einer Nähragarplatte aus (Fleischextrakt-Pepton-Agar oder Krebsagar), so bemerkt man, daß auf dem Strich genau so viel Bakterien wachsen, wie wenn man von einer Agarkultur abgeimpft hätte. Das Merkwürdigste ist nun, daß diese Bakterien in der Hauptsache nicht grampositiv sind, sondern gramnegativ. Sie zeigen die Merkmale der Krebsbazillen: daneben finden sich nur selten und in geringer Zahl noch andere Formen: wiederholt stellte ich z. B. *Bacterium prodigiosum* fest. Die angegebenen Bakterienfunde machte ich nicht nur bei *Periplaneta americana*, sondern auch bei unseren einheimischen Schabenarten *P. orientalis* und *Blatta germanica*. Auch die mir vom Berliner Aquarium zur Verfügung gestellte sehr stattliche *Blabera gigantea* (s. Fig. 9) zeigte den gleichen Befund. In allen Fällen enthielten die Fettkörper große Mengen von Bakterien der Krebsbazillengruppe; meist fanden sich diese neben den grampositiven *Cuenoti*-Formen in Reinkultur.

Es liegt nach diesen Befunden natürlich nahe, anzunehmen, daß die Ergebnisse Fibigers im wesentlichen durch die von diesem nicht beschriebenen Bakterien hervorgerufen wurden, und daß die *Spiropteren* nur die Rolle des die Infektion vermittelnden Reizes übernahmen. Leider mußte ich auch in dieser Richtung angestellte Versuche bereits nach 3 Wochen abbrechen. Die mit den Schabenbakterien geimpften Tiere zeigten nach dieser Zeit teilweise Tumoren, die infiltrierendes Wachstum zeigten und gleichaltrigen, mit echtem Krebsmaterial erzeugten Tumoren ähnlich waren. Einen Beweis der Identität konnte ich natürlich in der kurzen Versuchszeit nicht erbringen.

Es ist möglich, daß Nachuntersuchungen zeigen, daß die Schabenbakterien mit den Krebsbakterien nicht identisch sind. Von größerer Bedeutung für die Krebsforschung ist aber das durch die vorstehend beschriebenen Untersuchungen sichergestellte Ergebnis, daß Bakterien, die wie der echte Krebsbazillus der *Fluorescens*-Gruppe angehören, im gesunden Gewebe lebender Tiere in großen Mengen symbiontisch leben können, und zwar in einer Form, die wir mit den üblichen Methoden mikroskopisch nicht nachweisen können, d. h. die Bakterienkurzstäbchen, die wir regelmäßig in der Kultur erhalten, befinden sich nicht im Zellgewebe.

Die Erforschung der intrazellulären Symbiosen, die namentlich durch das schöne Buch Buchners (5) in weiten Kreisen bekannt geworden sind, zeigen hier eine große Lücke. Es sind bisher wohl ausschließlich die Symbionten berücksichtigt worden, die in mikroskopischen Schnitten beobachtet wurden.

Vielleicht spielen die nach dieser Methode nicht wahrnehmbaren Formen in manchen Fällen eine viel größere Rolle. Eine interessante und naheliegende Frage, die ich ebenfalls leider nicht durchführen konnte, ist die, ob die in den Fettkörpern der Schaben gefundenen grampositiven Cuenoti-Formen und die beschriebenen Fluorescens-Formen Zyklusformen desselben Organismus sind. Nach meinen bisherigen Beobachtungen halte ich das für möglich.

Ich bin überzeugt, daß die intrazellulären Bakteriensymbiosen bei allen Organismen eine weit größere Rolle spielen, als man bisher annimmt. Die Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, daß die meisten in dieser Beziehung genau untersuchten niederen Tiere auffällige Symbiosen zeigen; fast ganz fehlen (abgesehen von den Versuchen der erwähnten französischen Forscher) Untersuchungen in dieser Richtung bei höheren Tieren und Menschen, weil man von der falschen Voraussetzung ausging, daß man die Symbionten mikroskopisch hätte längst beobachten müssen. Kann jemand behaupten, daß etwa die Fettkörper in der weiblichen Mamma sich in bezug auf Symbioseverhältnisse prinzipiell anders verhalten als die Fettkörper von Insekten? Wenn in diesen Fettkörpern ebenfalls symbiontische Bakterien regelmäßig oder gelegentlich vorhanden sind, wäre die jetzt rätselhafte Frage, weshalb bei geringen Beschädigungen, wie Druck oder Schlag, in diesen Organen so leicht Krebskrankheit entsteht, ohne weiteres erklärt [man beachte hierzu die Theorie Portiers (17)]. Die angedeutete Frage ist eines der vielen in dieser Arbeit angeschnittenen Probleme, von denen ich besonders bedauere, daß es mir nicht möglich war, umfassende Untersuchungen darüber anzustellen.

Einzelne Fälle von gehäuften Auftreten der Krebskrankheit dürften sich durch die angegebenen Untersuchungen über die Möglichkeit des Vorkommens des Krebserregers in der Natur erklären lassen. Neuerdings von mir (12) in großem Umfange ausgeführte Untersuchungen natürlicher Kohlenlager ergaben die interessante Tatsache, daß Braunkohlenflöze eine reiche Bakterienvegetation aufweisen, die fast ausschließlich aus Vertretern der Fluorescens-Gruppe besteht. Echte Krebsbakterien können sich auf Braunkohle gut vermehren; in der Kohle wurden andererseits Formen gefunden, die ich nicht von den aus Tumoren isolierten Stämmen unterscheiden konnte. Das häufige Vorkommen von Krebs bei Brikettarbeitern, die dauernd dem bakterienhaltigen Kohlenstaub ausgesetzt sind, dürfte darin seine Erklärung finden. Eine viel besprochene Erscheinung ist der sogenannte „Schneeberger Lungenkrebs“. Die Bergleute der bei Schneeberg in Sachsen gelegenen Erzbergwerke erkranken häufig an Lungenkrebs; von einer Kommission durchgeführte eingehende Untersuchungen (19) über die Ursache dieser Erscheinung konnten keine Aufklärung bringen. Merkwürdigerweise erhält der Bericht neben vielen anderen Untersuchungen keinerlei Angaben über bakteriologische Befunde. Nach den von mir in den Kohlenbergwerken des Ruhrgebietes angestellten Untersuchungen ist es keineswegs ausgeschlossen, daß die Erkrankung auf Bakterien zurückzuführen ist, die mit dem Gesteinsstaub eingeatmet wurden.

Nach allen von mir bisher durchgeführten, vielfach leider unvollendeten Untersuchungen besteht kein Zweifel, daß die allgemeine Verbreitungsmöglichkeit des Krebserregers in der Natur außerordentlich groß ist, viel größer jedenfalls als bei den Erregern anderer weit verbreiteter Infektionskrankheiten.

Allgemein-bakteriologische Bemerkungen.

Nach den alten, bisher noch fast allgemein herrschenden Anschauungen der Bakteriologie ist das Krebsproblem überhaupt unlösbar; zur Klärung der Biologie der Krebskrankheit sind folgende allgemeine Gesichtspunkte zu be-

rücksichtigen: Ich habe bisher in langjährigen Untersuchungen zwei große Gruppen von Mikroorganismen studiert, die Strahlenpilze und die Gruppe des *Bacterium fluorescens*. Die Ergebnisse dieser sehr ausgedehnten Untersuchungen sind identisch; es zeigte sich nämlich, daß von einer Aufrechterhaltung der Artbegriffe, wie sie jetzt die Grundlage der Bakteriensystematik bilden, keine Rede sein kann. Man kann zwar innerhalb der großen Gruppen einzelne Typen herausdifferenzieren; die Unterscheidungsmerkmale dieser Typen sind aber größtenteils nicht konstant; außerdem gibt es alle nur denkbaren Uebergänge zwischen den einzelnen Formen. Will man z. B. nach einer genauen Originalbeschreibung eine Reinkultur eines echten *B. fluorescens* herstellen, so wird man vielleicht von hundert in diese Gruppe gehörigen Stämmen einen oder zwei herausfinden, die wirklich alle die angegebenen Merkmale besitzen; die übrigen 98 Kulturen werden als unecht verworfen. Wenn sich später zeigt, daß auch die ursprünglich echte Kultur abweichende Merkmale aufweist, so wird sie als degeneriert oder verunreinigt ebenfalls verworfen. Diese heute noch fast allgemein übliche Art der Bakteriologie ist zwar sehr bequem, leider aber in keiner Weise exakt, selbst dann nicht, wenn man „Einzellkulturen“ verwendet, die immer noch als Gipfel der Exaktheit gelten.

Der erste Hauptfehler, der dabei gemacht wird, beruht darauf, daß auch eine Einzellkultur keineswegs ein homozygotisches Material darstellt. Eine solche aus einer Zelle gewonnene Reinkultur entspricht botanisch etwa einer Kultur von blauen Stiefmütterchen, die man alle durch Stecklinge von einer Pflanze gezogen hat. So lange man diese immer in gleicher Weise vermehrt, bleibt die Kultur konstant und rein; tritt sexuelle Vermehrung ein, so treten zwischen den blauen Stiefmütterchen Pflanzen mit allen möglichen anderen Blütenfarben auf; die Kultur ist verunreinigt, genau so, wie man das zuweilen an exakt isolierten Bakterienkulturen beobachtet. Daß solche Abweichungen bei lange in Kultur befindlichen Bakterien verhältnismäßig selten vorkommen, liegt an der üblichen Kulturmethode, die eine sexuelle Vermehrung ausschließt oder erschwert. Nach den Erfahrungen, die ich in den letzten Jahren auf diesem Gebiete gemacht habe, spielt die Bastardierung bei Mikroorganismen mindestens dieselbe Rolle wie bei höheren Pflanzen. Daß innerhalb einer Bakteriengruppe sich immer nur die Formen vereinigen, die zufällig gerade genau dieselben morphologischen und physiologischen Eigenschaften aufweisen, kann nur der annehmen, der sich selbst niemals eingehender mit dieser Frage befaßt hat.

Der zweite große Fehler, der heute noch von den weitaus meisten Bakteriologen gemacht wird, ist der, daß man morphologisch und physiologisch verschiedene Bakterienformen ohne weiteres als verschiedene „Arten“ ansieht. Daß ein gramnegatives Bakterium eine andere Art darstellt als ein grampositiver Bazillus, erscheint selbstverständlich. Ein Farnprothallium sieht aber auch ganz anders aus als eine Farnpflanze; es ist ausgeschlossen, daß jemand, der die Umwandlung der Formen nicht genau beobachtet hat oder der von anderen über diesen Vorgang aufgeklärt worden ist, wissen kann, daß es sich um dieselbe Pflanze handelt. Die entsprechenden Verhältnisse sind in der Bakteriologie zuerst von Löhnis (13) geklärt worden; es ist bedauerlich, daß diese für alle Zeiten grundlegenden Arbeiten bisher so wenig beachtet wurden. Nur ein genaues Studium des Krebserregers nach den angedeuteten Gesichtspunkten wird eine restlose Klärung der Krebsfrage bringen.

Aus vorstehenden Ausführungen ergibt sich ferner, daß die bisher in der Literatur für Bakterien übliche Nomenklatur geändert werden muß. So weit sich bis jetzt sehen läßt, dürfte vielleicht allen Bakterien ein grampositives

und ein gramnegatives Entwicklungsstadium zukommen. Der Krebsbazillus bildet neben den gramnegativen Stäbchen ebenso charakteristische Streptokokken und grampositive Stäbchen. Man kann ihn mit dem gleichen Rechte als *Pseudomonas*, *Bazillus*, *Bakterium*, *Mikrokokkus* und *Streptokokkus* bezeichnen. Da natürlich eine vollkommene Neubenennung aller Bakterien vermieden werden muß, schlage ich vor, die alten Namen beizubehalten; aber bei Formen, bei denen man nachgewiesen hat, daß sie noch unter andere Gattungsnamen fallende Kreislaufformen aufweisen, zur Bezeichnung der Vielgestaltigkeit die Silbe *Poly-* vor den bisherigen Gattungsnamen zu setzen. Den Krebserreger nenne ich, um die Bezeichnung *Polypseudomonas* zu vermeiden, *Polymonas tumefaciens*.

Von den vielen interessanten Beobachtungen, die ich im Verlaufe meiner Untersuchungen über den Krebserreger gemacht habe, soll hier nur noch eine angedeutet werden, die bei näherer Untersuchung vielleicht von größerer Bedeutung werden kann. Schon E. Smith gibt in seiner Originalbeschreibung des *Bacterium tumefaciens* an, daß dieses „aus verschiedenen Zuckern Säure bildet“. Dieses Vermögen der Säurebildung ist aber nicht konstant, es verschwindet bei den verschiedenen Stämmen nach längerer oder kürzerer Kulturdauer. Diese Beobachtung des kurz nach der Isolierung sehr starken Säurebildungsvermögens kann man namentlich auch bei Stämmen machen, die aus Krebsgeschwülsten von Menschen und Tieren isoliert wurden. Alles deutet darauf hin, daß im Organismus von den Bakterien viel mehr Säure gebildet wird als in Kulturen. Die von Warburg nachgewiesene starke Milchsäurebildung in den Krebsgeschwülsten wurde in letzter Zeit von manchen Forschern, namentlich auch von vielen praktischen Aerzten als eigentliche Ursache des Krebses angesehen. In Wirklichkeit dürfte es sich aber dabei nicht um die Ursache der Krankheit handeln, sondern lediglich um eine Folge der Infektion mit Krebsbazillen. Ich vermute auf Grund meiner Beobachtungen, daß die Milchsäurebildung in den Krebstumoren lediglich ein durch den Krebsbazillus hervorgerufener Gärungsprozeß ist, der sich bei geeigneter Versuchsanstellung in gleicher Weise außerhalb des Organismus mit Reinkulturen *in vitro* durchführen läßt. Daß andererseits die durch die Bakteriengärung gebildete Milchsäure auf die Entwicklung der Geschwülste einen entscheidenden Einfluß hat, ist wahrscheinlich.

Ueber weitere Beobachtungen, die sich auf die Erscheinungen der Krebskachexie, auf die Möglichkeit einer bakteriologischen Krebsdiagnose sowie auf neue Gesichtspunkte für die Therapie beziehen, hoffe ich später noch näher berichten zu können.

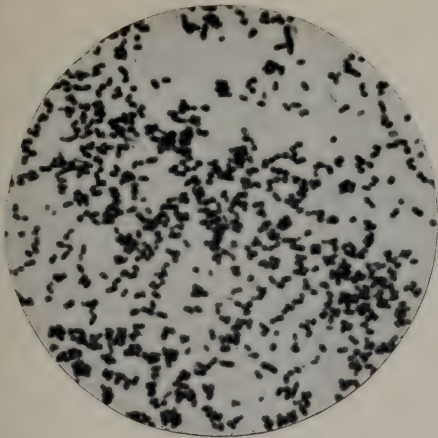
Ich betone nochmals, daß vorstehende Ausführungen lediglich ein Fragment darstellen. Zahlreiche aussichtsreiche Versuche mußte ich abbrechen, da mir die Mittel zu ihrer weiteren Durchführung nicht zur Verfügung standen. Der Bericht kann also nur den Charakter einer vorläufigen Mitteilung haben. Selbstverständlich erhebe ich auch keinerlei Ansprüche auf Priorität der mitgeteilten Beobachtungen, da ich verschiedene und gerade die wichtigsten das Gebiet betreffenden Arbeiten nicht im Original einsehen konnte. — Der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft spreche ich auch an dieser Stelle meinen verbindlichsten Dank dafür aus, daß sie mir Mittel zur Anschaffung von Versuchstieren und Instrumenten zur Verfügung stellte. Zu ganz besonderem Danke bin ich Herrn Dr. med. Christeller, Vorstand des Pathologischen Instituts am Rudolf Virchow-Krankenhaus in Berlin, verpflichtet. Durch seine Vermittlung erhielt ich fast das gesamte, für die Untersuchung verwendete Sektionsmaterial. Die pathologischen Befunde meiner Tierversuche, über die ich später noch näher zu berichten gedenke, wurden von ihm festgestellt. Da

ich nicht mehr in der Lage bin, die in der Arbeit beschriebenen Kulturen weiter fortzuzüchten, habe ich eine Anzahl charakteristischer Stämme der Sammlung von Prof. Přibram (früher Králs Bakteriologisches Museum) in Wien übergeben, so daß jedem Material zur Nachprüfung zur Verfügung steht.

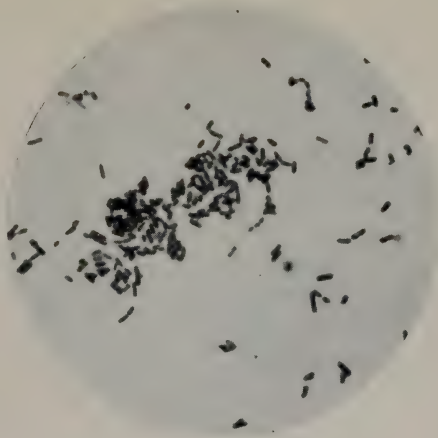
Im folgenden gebe ich eine kurze Zusammenfassung der Schlußfolgerungen, die ich aus meinen Versuchen ableite. Ich bin mir natürlich bewußt, daß die von mir gegebene Beweisführung in vielen Punkten noch unvollständig ist, so daß die Ausführungen in erster Linie als Arbeitshypothese anzusehen sind. Ich bin überzeugt, daß auf dem angegebenen Wege das Ziel der restlosen Klärung der Krebsfrage eher erreicht wird als auf vielen, bisher erfolglos beschrittenen Pfaden.

Zusammenfassung.

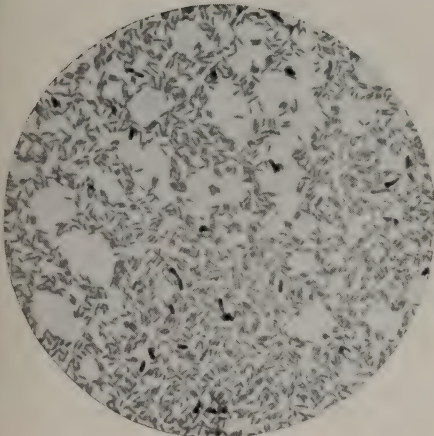
1) Der Krebs ist eine echte, typische Infektionskrankheit. Die Theorien, die den Krebs als eine Stoffwechselkrankheit ansehen oder die ihn auf äußere Reize verschiedenster Art zurückführen wollen, stehen außerhalb jeder Diskussion, da keine von ihnen die Uebertragbarkeit erklären kann. — 2) Genau so wie andere Infektionskrankheiten wird der Krebs nur durch einen einzigen, spezifischen Erreger hervorgerufen. Die einzelnen aus Krebstumoren isolierten Stämme zeigen innerhalb einer bestimmten Variationsbreite gewisse Abweichungen, genau so, wie das bei anderen Bakterienarten der Fall ist. Für die Annahme, daß verschiedene Organismen den Krebs verursachen können, liegt kein Grund vor. — 3) Der Krebserreger wurde bereits von verschiedenen Forschern richtig erkannt und beschrieben, und zwar in der Hauptsache als filtrierbares Virus, als gramnegatives, einpolig begeißeltes Stäbchen (*Bacterium tumefaciens*), als grampositives Stäbchen von variabler Gestalt und als Streptokokkus. Alle diese Formen, die bisher als verschiedene Bakterienarten angesehen worden sind, dürften Kreislaufformen desselben Organismus im Sinne von Löhnis sein. — 4) Der Krebserreger wird, da seine verschiedenen Kreislaufformen nach der bisher üblichen Nomenklatur verschiedene Gattungsnamen haben müßten, als *Polymonas tumefaciens* bezeichnet. — 5) Die in Krankheitsfällen beobachteten und bei Tierversuchen zur experimentellen Erzeugung des Krebses angewendeten Reize verschiedenster Art sind nicht Ursache des Krebses, sie vermitteln lediglich den Krebsbazillen die Möglichkeit der Infektion. — 6) Die Krebskrankheiten bei Menschen, Tieren und Pflanzen sind analoge und homologe Erscheinungen. — 7) So weit bisher festgestellt werden konnte, ist der Krebserreger in der Natur als Saprophyt weit verbreitet. Die Bedingungen, unter denen er vom harmlosen Saprophyten zum Krankheitserreger wird, sind unbekannt, d. h. wir wissen vom Krebserreger ebenso wenig wie von anderen pathogenen Bakterien, worauf der Faktor „Virulenz“ beruht. — 8) In den Krebsgeschwülsten bei Menschen, Tieren und Pflanzen befindet sich der Krebserreger normalerweise in mikroskopisch nicht erkennbarer Form (filtrierbare Gonidien, Symplasma?); er scheint in engster Symbiose mit den Wirtszellen zu leben. — 9) Die in den Krebsgeschwülsten beobachtete Milchsäurebildung dürfte identisch sein mit der



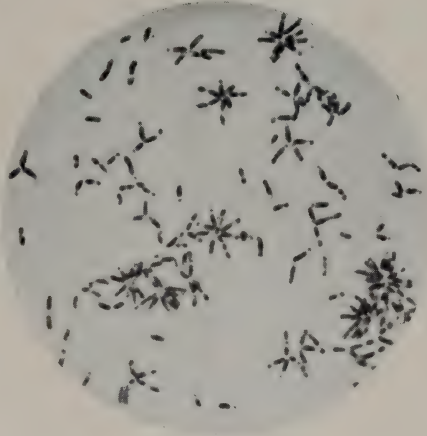
1



2



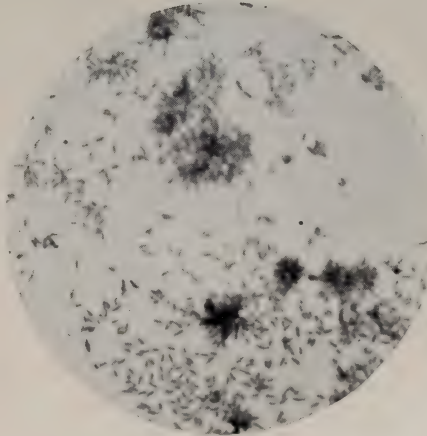
3



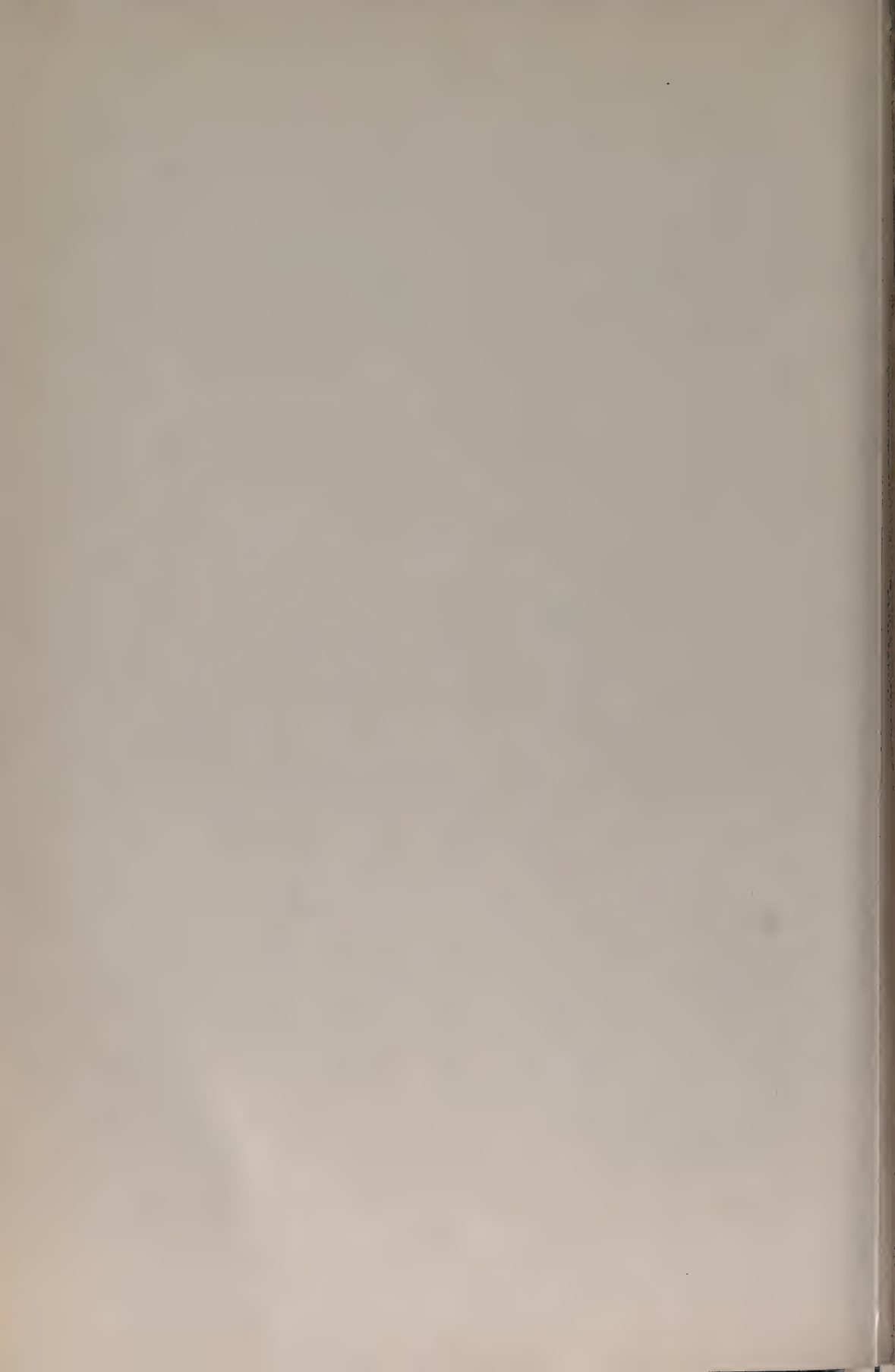
4

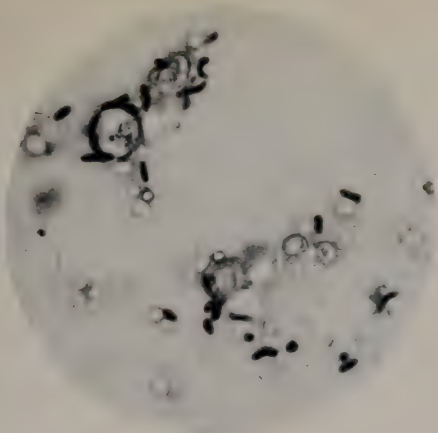


5

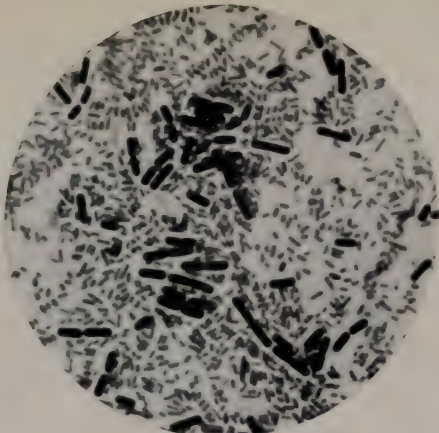


6





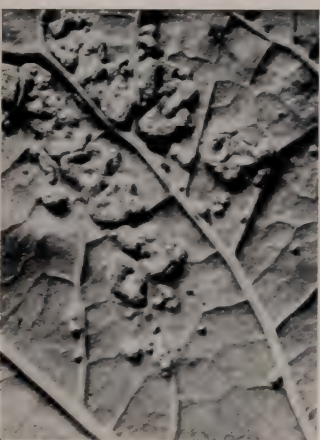
7



8



9



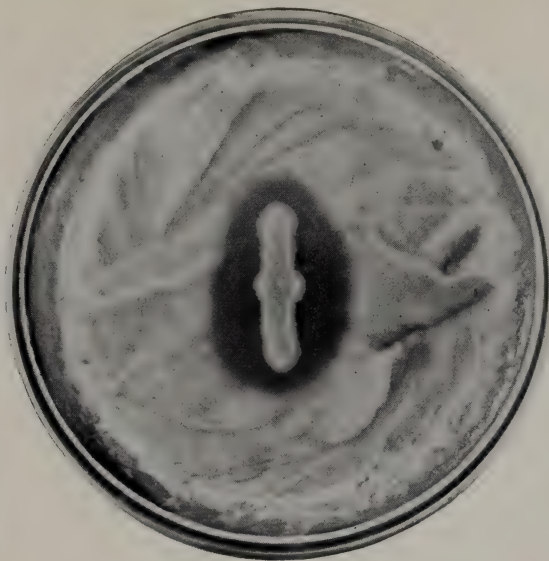
10



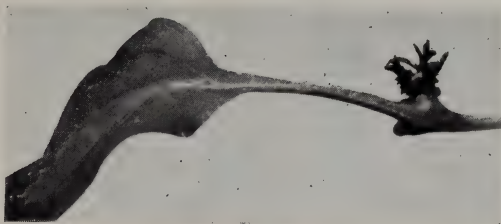
11



12



13



14



15



16

Säurebildung, die wir an Reinkulturen des Krebserregeres *in vitro* beobachten können.

Erklärung der Tafelabbildungen.

Tafel I.

Fig. 1. Gramnegative Krebsbakterien aus einem Lebertumor des Menschen. 24 Std. bei 33° auf Krebsagar. Karbolfuchsin. 1:1000.

Fig. 2. Grampositive Krebsbakterien aus demselben Tumor wie Nr. 1, 48 Std. in 1proz. Malzextrakt-Gelatine-Lösung bei 33°. Gramfärbung. 1:1000.

Fig. 3. *Bacterium tumefaciens*, Originalstamm von E. Smith, seit etwa 20 Jahren in Kultur, noch stark pflanzenpathogen, 48 Std. auf Krebsagar bei 33°. Karbolfuchsin. 1:1000.

Fig. 4. Derselbe Stamm wie in Fig. 3, 24 Std. in 1proz. Malzextrakt-Gelatine-Lösung kopulierend. Karbolfuchsin. 1:1000.

Fig. 5. Krebsbakterien aus einem Mammakarzinom, kopulierend, Karbolfuchsin.

Fig. 6. Die in Fig. 4 abgebildete Kultur 8 Tage später, Symplasmabildung. Karbolfuchsin. 1:1000.

Tafel II.

Fig. 7. Direkter Ausstrich aus dem Fettkörper von *Periplaneta americana*. Gramfärbung. Dicke, grampositive *Cuenoti*-Bazillen, gramnegative Bakterien sind nicht zu erkennen. 1:1000.

Fig. 8. Ausstrich desselben Materials wie in Fig. 7 auf einer Fleischextrakt-Pepton-Agarplatte. 24 Std. bei 33°. Gramfärbung. Neben den dicken *Cuenoti*-Bazillen haben sich zahlreiche gramnegative Bakterien der Fluoreszenzgruppe entwickelt. 1:1000.

Fig. 9. Links *Blabera gigantea*, rechts *Periplaneta americana*, beide Formen enthalten in ihren Fettkörpern in mikroskopisch nicht erkennbarer Form Bakterien der Krebserregergruppe. 1:1.

Fig. 10. Tumoren auf der Unterseite eines Blattes, das mit verdünnter Säure behandelt wurde. Nach E. Smith.

Fig. 11. Schnitt durch ein Sarkom einer Maus, das durch eine Reinkultur von Krebsbakterien erzeugt wurde, die aus einem Rattensarkom isoliert wurden. 1:150.

Tafel III.

Fig. 12. Zuckerrübe, geimpft mit Krebsbakterien aus einem Mammakarzinom. 1:1.

Fig. 13. Krebsagarplatte, auf der eine Aufschwemmung von Krebsbakterien ausgespatelt wurde. Um den Impfstich von Staphylokokken, die aus einem Rattensarkom isoliert wurden, bildete sich ein breiter, steriler Hof.

Fig. 14. Blattstiel von *Solanum nigrum*, auf dem in der Mitte befindlichen Impftumor bildet sich eine neue Pflanze.

Fig. 15. Impftumor an *Pelargonium*, besteht hauptsächlich aus parenchymatischem Gewebe.

Fig. 16. Mit demselben Bakterienstamm erzeugter Impftumor an *Datura Metel*. In dem Tumor lassen sich fast alle denkbaren Zellformen nachweisen.

Literatur.

- 1) Bericht über die 12. Tagung der Deutschen Vereinigung für Mikrobiologie. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 104. 1917. S. 21.) — 2) Bertrand, Etude biochimique de la bactérie du sorbose. (Thèse Fac. Sc. Paris 1904.) — 3) Binz und Räth, Zur Aetiologie bösartiger Tumoren. (Ztschr. f. angew. Chem. Bd. 39. 1926. S. 1177 und Sitzung des Deutsch. Zentralkomitees zur Erforschung der Krebskrankheit. Sept. 1926.) — 4) Blumenthal, Meyer u. Auler, Ueber das Vorkommen neoplastischer Bakterien in menschlichen Krebsgeschwülsten. (Ztschr. f. Krebsforsch. Bd. 21. 1924. S. 387.) — 5) Buchner, Tier und Pflanze in intrazellulärer Symbiose. Berlin 1921. — 6) Fibiger, Untersuchungen über das Spiroterakarzinom. (Ztschr. f. Krebsforsch. Bd. 17. 1919. S. 1.) — 7) Galippe, Parasitisme normal et microbiose. Paris (Masson) 1917. — 8) Glover, Zitiert nach Teutschländer, 23. — 9) Gye und Barnard, Lancet Bd. 209. 1925. p. 199. — 10) Kauffmann, Ueber Bakterienbefunde im Mäusekarzinom und Zur Erzeugung von Pflanzengeschwülsten durch T.-Bakterien. (Ztschr. f. Krebsforsch. Bd. 23. 1926 und Bd. 24. 1927.) — 11) Lieske, Unter-

suchungen über die Mauke der Weinreben. (Arb. a. d. Biol. Reichsanstalt für Land- und Forstwirtschaft. Bd. 15. 1927. H. 2.) — 12) Lieske und Hoffmann, Untersuchungen über die Mikrobiologie der Kohlen. (Brennstoffchemie 1927. Nr. 11.) — 13) Löhnis, Studies upon the life cycles of the bacteria. (National Acad. of Sc. Washington 1921.) — 14) Loudon u. Cormack, Zit. nach Teutschländer, 23). — 15) Nuzum, ebenda. — 16) Ochsner, ebenda. — 17) Portier, Les Symbiotes. Paris (Masson) 1918. — 18) Reichert, Ueber tumorerzeugende Bakterien. (Ztschr. f. Krebsforsch. Bd. 22. 1925. S. 446.) — 19) Rostoski u. Saupe, Der Schneeberger Lungenkrebs. (Ztschr. f. Krebsforschung. Bd. 23. 1926. S. 360.) — 20) Scott, zit. nach Teutschländer, 23. — 21) Smith An introduction to Bacterial Diseases of plants. Philadelphia and London 1920. — 22) Smith a. Townsend, A plant tumor of bacterial origin. (Science N. S. Vol. 25. 1907. p. 671.) — 23) Teutschländer, Infektion und Krebs. (Ztschr. f. Krebsforsch. Bd. 24. 1926. S. 223.) — 25) Young, Description of an Organism obtained from carcinomatous growth. (Edinburgh Med. Journ. Okt. 1921; dgl. Sept. 1922; dgl. Juni 1922; dgl. Juli 1924.)

Nachdruck verboten.

Acanthocephalen der Fische des Goktscha-Sees.

(Aus dem Zoologischen Institut der Militär-Medizinischen Akademie in Leningrad (Direktor: Prof. E. N. Pawlowsky).)

Von Dr. N. N. Kostylew.

Mit 7 Abbildungen im Text.

Als Material für die vorliegende Arbeit haben die im Jahre 1923 von der helminthologischen Expedition von Prof. K. J. Skrjabin in Armenien gesammelten Acanthocephalen gedient. In dem mir zur Verfügung gestellten Material waren 2 neue Arten, von welchen die eine der Gattung *Quadrigyryus* angehört, deren Vertreter in der Alten Welt bis jetzt nicht vorgefunden wurden; die 3. Art erwies sich als bereits bekannt. Ich gehe zur Beschreibung der vorhandenen gewesen Arten über.

Gattung *Quadrigyryus* v. Cleave.

Diese Gattung gehört zur Unterfamilie der *Quadrigyryinae*, welche einen Bestandteil der Familie des *Neoechi nochynchidae*¹⁾ bildet. Diese Gattung zeichnet sich dadurch aus, daß der Vorderteil des Körpers, zum Unterschied von den übrigen *Neoechinorhynchiden*, von kleinen Dörnchen bekleidet ist, welche beim typischen Vertreter dieser Gattung, dem *Q. torquatus* V. Cl., 4 ringförmige Reihen bilden; diese Zahl nennt Van Cleave in der Charakteristik der Gattung²⁾. Bei dem hier beschriebenen neuen Vertreter dieser Gattung ist die Zahl der ringförmigen Dörnchenreihen am Körper viel größer. Auf Grund dieses Unterschieds allein hielt ich es aber nicht für notwendig, eine neue Gattung aufzustellen. Die folgenden charakteristischen Merkmale dieser Gattung sind: die Bewaffnung des aus 4 ringförmigen Hakenreihen bestehenden Rüssels, die Lage des Kopfganglion am Grund des Hohlraums der einschichtigen Rüsselscheide und schließlich das Vorkommen im Hypoderm der erwachsenen Exemplare von baumartig verzweigten Kernen. Fischparasiten.

1) Travassos, L., Contribuições para o conhecimento da fauna helmintologica brasileira. (Memor. do Inst. Osw. Cruz. T. 19. 1926. Fasc. 1.)

2) Van Cleave, J. P., Two genera and species of Acanthocephalous worms from Venezuelan fishes. (Proceed. U. S. Nation. Musum. Vol. 58. 1920).

Quadrigyrus cholodkowskyi n. sp. (Fig. 1—3).

Wirt: *Varicorinus sevangi* (Filippi); Lokalisation: Darmkanal.

Die Männchen sind bis 14 mm lang, 1,2 mm dick, die Weibchen bis 22,0 mm lang und bis 2 mm dick. Vorderteil des Körpers von 10 vollkommenen ringförmigen Reihen von kleinen (0,007 mm langen) Dörnchen bekleidet, auf welche Dörnchenreihen folgen, die sich an der Dorsalseite des Körpers nicht zu Ringen schließen und an der Ventralseite allmählich verschwinden; am hinteren Körperende kommen keine Dornen vor. Der Rüssel ist halbkugelförmig, seine Dimensionen betragen 0,135—0,15 : 0,135—0,15 mm, seine Bewaffnung besteht aus

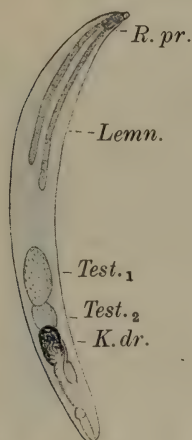


Fig. 1.

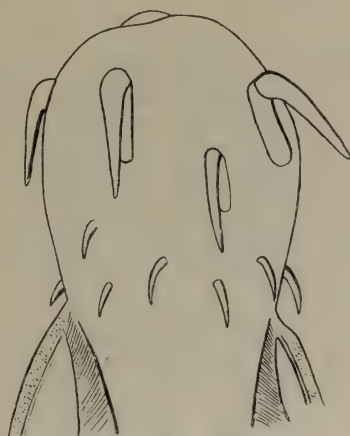


Fig. 2.

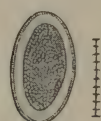


Fig. 3.

Fig. 1. *Quadrigyrus cholodkowskyi* n. sp. ♂.

Fig. 2. *Quadrigyrus cholodkowskyi* n. sp. Rüssel.

Fig. 3. *Quadrigyrus cholodkowskyi* n. sp. Ei.

18 Haken, von welchen 6 näher zur Spitze liegen, groß sind und in 2 ringförmige Reihen angeordnet sind, so daß die 1. Reihe aus 4 Haken besteht, während in der 2. Reihe nur 2 Haken vorhanden sind. Die übrigen 12 kleineren Haken sind in 2 ringförmigen Reihen angeordnet. Im allgemeinen erinnert der Charakter der Rüsselbewaffnung sowohl in bezug auf die Verteilung der Haken, als auch in bezug auf die Form dieser letzteren an den *Neoechinorhynchus rutili*, doch sind die Haken viel kleiner (obwohl der Körper sehr groß ist), als bei diesem letzteren, wie aus der beistehenden Tabelle ersichtlich ist.

Größe der Haken des *Q. cholodkowskyi*.

	Länge der Hakens	Länge der Wurzeln
1. ringförmige Reihe	0,069—0,0785 mm	0,05—0,06 mm
2. „ „	0,0552—0,0643 „	0,046 mm
3. „ „	0,0357—0,0414 „	konnten nicht deutlich
4. „ „	0,0368 mm	konstatiiert werden

Hals sehr kurz. Die Länge der Rüsselscheide 0,4—0,47 mm. Die Lemnisk sind sehr lang (3,0—5,0 mm und etwas länger). Testiculi im hinteren Körperabschnitt einer nach dem anderen gelegen. An dem letzten Testiculus liegt eine Kittdrüse. Wie bei allen bis jetzt bekannten *Neoechinorhynchiden* ist eine

einzigste Kittdrüse vorhanden. Eier sind oval, in konzentrische Hüllen eingeschlossen, äußere Hülle gestrichelt. Die häufigste Größe der Eier ist 0,033 : 0,0198 mm; viel seltener kommen größere Eier von 0,0352—0,0374 mm und 0,0198—0,022 mm vor.

Diese Art benenne ich zu Ehren meines verstorbenen Lehrers, des Prof. Dr. N. A. Cholodkowsky, unter dessen Leitung ich meine helminthologischen Untersuchungen begonnen habe.

Echinorhynchus baeri n. sp. (Fig. 4—7).

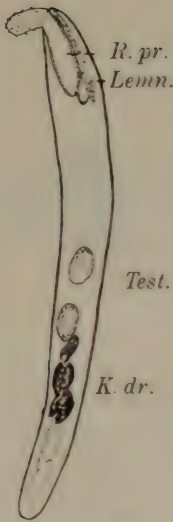


Fig. 4.



Fig. 5.

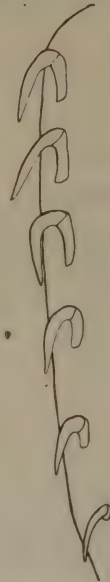


Fig. 6.

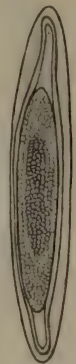


Fig. 7.

Fig. 4. *Echinorhynchus baeri* n. sp. ♂.

Fig. 5. *Echinorhynchus baeri* n. sp. Rüssel.

Fig. 6. *Echinorhynchus baeri* n. s. Einzelne Haken der Rüssel.

Fig. 7. *Echinorhynchus baeri* n. sp. Ei.

Zeichenerklärung der Figuren.

Lemn. = Lemniscen; R. pr. = Receptaculum proboscidis; Test. = Testis; K. dr. = Kittdrüsen.

Wirt: *Salmo ischan* Keßler (Darmkanal).

Die Männchen erreichen eine Länge von 7,5 mm, die Weibchen von 11—12,0 mm maximaler Dicke von 0,6—0,75 mm. Rüssel ist zylinderförmig mit abgerundeter Spitze; an der Basis ist er etwas verengert, seine Länge beträgt bis 0,77 mm bei einer Dicke von 0,3—0,38 mm im mittleren Teil; er liegt bezüglich der Längsachse des Körpers in einem Winkel angeordnet. Bewaffnung des Rüssels besteht aus 22—24 Längsreihen, welche je 10 Haken enthalten. Diese besitzen, mit Ausnahme der in den letzten ringförmigen Reihen angeordneten Haken, eine gerade, nach hinten gerichtete Wurzel. Die an der Ventralseite des Rüssels befindlichen Haken sind mächtiger entwickelt und stärker gebogen als die entsprechenden Haken der Dorsalseite, wie folgende Tabelle zeigt:

Stellung des Hakens in der Längsreihe	Dorsalseite		Ventralseite	
	Länge des Hakens	Länge der Wurzeln	Länge des Hakens	Länge der Wurzeln
3.	0,0736 mm	0,0552 mm	0,0782 mm	0,0690 mm
4.	0,0736 "	0,0690 "	0,0828 "	0,0690 "
5.	0,0920 "	0,0690 "	0,0828—0,0874 mm	0,0736 "
6.	0,0782 "	0,0690 "	0,0920 mm	0,0920 "
7.	0,0644 "	0,0644 "	0,0920 "	0,0644 "
8.	0,0460 "	—	0,0644 "	0,0368 "
9.	0,0460 "	—	0,0460 "	—
10.	0,0460 "	—	0,0460 "	—

Der Hals ist nicht deutlich ausgesprochen. Rüsselscheide bis 1,4 mm lang, Lemnischen reichen nicht über die Länge der Rüsselscheide hinaus. Testiculi in der hinteren Körperhälfte, Dimensionen des vorderen Testiculus 1,55 bis 1,7:0,3—0,38 mm, unmittelbar hinter ihm liegt der 2., 0,38—0,5:0,3 bis 0,32 mm große Testiculus. Kittdrüsen direkt hinter dem hinteren Testiculus paarweise angeordnet (im ganzen deren 6 vorhanden). Eier oval, 0,1056—0,126:0,022—0,024 mm groß; zuweilen kommen auch größere 0,145:0,024 mm messende Eier vor. Größe des unter den Eihüllen gelegenen Embryos beträgt 0,07 mm.

In den Fischen der Gattung *Salmo* der europäischen Gewässer kommen der *Ech. truttae* Schr., *Ech. salmonis* Müll. und vielleicht noch der *Ech. clavula* Duj. vor (den letzteren führt Lühe in der Liste der Parasiten von *Salmo fario* L. mit einem Fragezeichen an¹⁾). Den Unterschied unserer Art von den genannten zeigt nachstehende Tabelle:

	<i>E. truttae</i>	<i>E. salmonis</i>	<i>E. clavula</i>	<i>E. baeri</i>
Länge des Körpers	♂ —10—11,0 mm ♀ —15—20	♂ —3—4 ♀ —7—8	♂ —3,5—1,2 ♀ —7	♂ —7,5 ♀ —12,0
Rüssel	Zylinderförmig	Fast zylinderförmig, an der Basis etwas verengert	In der hinteren Hälfte erweitert	Zylinderförmig
Zahl der Haken am Rüssel	20—22	14	18	22—24
Zahl der Haken in der Längsreihe	13—16	9—11	12—13	10
Anordnung der Kittdrüsen	Eine nach der anderen, mit Ausnahme der ersten zwei	Kompakt, nebeneinander	Kompakt, nebeneinander in unregelmäßiger paarweiser Anordnung	In unregelmäßiger paarweiser Anordnung
Eier	0,10—0,11:0,023—0,024 (Lühe) 0,136—0,141: 0,023—0,026 (v. Linstow)	0,095:0,025		0,1056—0,145: 0,022—0,024

Die Art benannte ich zu Ehren des Akademikers K. E. Baer (der am 28. XI. 1876 gestorben), früheren Professors der vergleichenden Anatomie und

1) Lühe, M., Acanthocephalen. Die Süßwasserfauna Deutschlands. H. 16. Jena 1911.

Physiologie an der Medizinisch-Chirurgischen (gegenwärtig Militär-Medizinischen) Akademie, der im Jahre 1928 zum Akademiker der Russischen Akademie der Wissenschaften gewählt worden) ist.

***Pomphorhynchus laevis* (Müller).**

Wirt: *Barbus goktschaicus* Kessl.,

Varicorhinus capoëta Sevangi (Filippi). Lokalisation: Darmkanal.

Die Weibchen erreichen eine Länge von 25—28 mm, die Männchen bis zu 15—16 mm, von denen etwa $\frac{1}{4}$ der Länge auf den Hals und die für die Vertreter dieser Art charakteristische Erweiterung desselben („Bulla“) kommt. Körper nicht von Dörnchen bekleidet, ziemlich dick (Weibchen bis 3,0 mm im vorderen Teil), sich allmählich nach hinten verengend. Der lange Hals (3,0 mm) trägt vorne die dünnwandige, blasenförmige Bulla, welche zusammen mit dem ihr aufsitzenden Rüssel tief in den Darmgeweben fixiert ist. Durchmesser der Bulla 3,0 mm. Rüssel zylinderförmig (0,9 : 0,34 mm), mit 18—20, aus 12 (selten 13) Haken bestehenden Längsreihen. Die die vordere Rüsselhälfte bekleidenden Haken unterscheiden sich scharf von den Haken der linken Rüsselhälfte: die Haken der vorderen ringförmigen Reihen, welche eine Länge von 0,04—0,05 mm aufweisen, werden nach hinten zu allmählich durch dickere und massivere Haken ersetzt, um dann auf einmal in kleine (0,033 mm) und feine, die hintere Rüsselhälfte bekleidende Haken überzugehen. Abgesehen davon unterscheiden sich die Wurzeln dieser und jener Haken voneinander: die ersteren haben eine nach hinten gerichtete Wurzel, welche am hinteren Ende etwas gespalten ist, während die letzteren eine Wurzel ohne solche Spaltung haben. Bei ihnen findet sich aber ein kleiner, nach vorne gerichteter Hoden. Rüsselscheide sehr lang (4,0 mm). Lemniskiten kurz (1,1 mm). Die ovalen Testiculi befinden sich in der hinteren Hälfte der Körperhöhle. Die 3 Paar Kittdrüsen sind in einer gewissen Entfernung von dem 2. Testiculus angeordnet. Eier länglich, mittlere Eihülle an den Polen stark in die Länge gezogen. Am häufigsten waren 0,1188 : 0,0165—0,0198 mm große, zuweilen auch größere (0,1419 : 0,0231 mm) Eier.

Leider stand mir keine genügende Zahl von Exemplaren des *P. laevis* aus europäischen Fischen zur Verfügung, so daß ich mich für die Zugehörigkeit der Exemplare aus dem Goktschasee zu dem *P. laevis* nicht mit Sicherheit äußern kann, und zwar um so mehr, als Lühe die Vermutung ausspricht in den europäischen Fischen könnten 2 verschiedene *Pomphorhynchus*-arten vorkommen, die bis jetzt unter dem gemeinsamen Namen *P. laevis* vereinigt worden sind.

Leningrad, 1. 10. 1927.

Nachdruck verboten.

Fettsäuren und Mycoides-Lysin.

[Aus dem Institut für experimentelle Therapie des allgemeinen Krankenhauses Hamburg-Eppendorf (Leiter: Prof. Dr. Hans Much).]

Von Dr. **Johann Schubert.**

Vor mehreren Jahren fanden Much und seine Mitarbeiter bei einem der Mesentericus-Gruppe nahestehenden Wurzelbazillus merkwürdige biologische Eigenschaften. Die von Flügge so benannten Wurzelbazillen wachsen hauptsächlich in 2 Arten. Der eine Teil wächst auf Agar stark verästelt, guirlandenartig, bildet auf Fleischbrühe kein Oberflächenhäutchen, sondern in der Flüssigkeit Schleier und Flocken, die sich langsam zu Boden senken. Diese selbst bleibt klar. Der andere Teil ist auffallend durch ziemlich schnelles flächenhaftes Wachstum auf der Agarplatte, sowie durch Häutchenbildung an der Oberfläche einer Fleischbrühe. Much hat nun bei dieser 2. Art festgestellt, daß einige der häutchenbildenden Stämme die Fähigkeit haben, Bakterienkulturen aufzuklären und die Bakterien selbst aufzulösen. Diese Fähigkeit ist an die Häutchenbildung geknüpft. Sie beruht nicht auf dem Absterben und Niedersinken der Bakterien. Much und Sartorius beobachteten dann die Eigenschaften dieser klärenden Häutchenbildner weiter und fanden, daß nicht die eiweißverdauende Kraft, oder diese nicht allein das Wirksame bei der Klärung und Auflösung der Bakterien sein kann, denn diese ist bei nicht klärenden Stämmen ohne Häutchenbildung weitaus am stärksten, ferner zeigen auch die Much-Stämme untereinander große Verschiedenheiten. Nicht nur diese Stämme, sondern auch die deren Wirkung unterworfenen Bazillen zeigen deutliche Unterschiede. Es zeigt sich da, daß Kulturen des 3. und 4. Tages die größte Widerstandsfähigkeit gegen die Einwirkung des Mycoides aufweisen, Bakterien jüngerer Kulturen scheinen noch nicht kräftig genug zu sein, sich zu wehren, ältere scheinen von ihrer Widerstandsfähigkeit verloren zu haben. Es gelang dann auch durch fortgesetzte schnelle Ueberimpfung von Mycoides auf Bakterienkulturen der gleichen Art die Lösungsfähigkeit des betreffenden Mycoides-Stammes hochzuzüchten. Wenn also eine solche Steigerung möglich war, dann konnte man wahrscheinlich auch das Lysin aus einer Bakterienklärung durch Filtration gewinnen und nachweisen. Das gelang, und damit war auch der Einwand gefallen, es könnte sich bei der Einwirkung auf die Bakterien einfach um Sauerstoffabschluß handeln. Ferner wurde festgestellt, daß für eine gewisse Bakterienmenge eine bestimmte Menge lösenden Stoffes, das heißt des Filtrates, zur völligen Lösung notwendig ist.

Untersuchungen an Bakterien und Blutkörperchen zeigten, daß hier wirklich eine vollständige Lyse vorliegt, daß die Wirkung des filtrierten Lysins nicht, wie beim d'Herelleschen Bakteriophagen durch viele Passagen übertragbar ist, auch vermag solches Filtrat mit Agar vermischt, auf aufgeimpften Bakterienkulturen keine Lochbildung zu erzeugen. Auch Destillationsversuche wurden gemacht. 20 ccm Coli-Filtrat und 20 ccm filtrierte Fleischbrühe wurden, jedes für sich, 1 Std. lang in Coli-Kulturen überdestilliert. Ebenso wurden die Destillatrückstände bei unsteriler Behandlung in andere Gefäße überführt und in Brutschranktemperatur gebracht. Es fand sich, daß auf die betreffenden Coli-Kulturen keine Einwirkung statthatte, daß aber von den Destillationsrückständen der Filtratrückstand klar und steril blieb, während

der Fleischbrühenrückstand sich durch Bakterienentwicklung zu trüben begann. In einem anderen Versuch wurde im Vakuum bei 60° destilliert, der Rückstand aber mit Aether ausgezogen. Weder das Destillat noch der Aetherauszug zeigten lösende Kräfte, während der nach der Aetherausziehung verbleibende Rückstand trotz Trocknung sich noch als schwach wirksam erwies. Es scheint also, daß man das wirksame Prinzip nicht unter den fettverwandten Körpern zu vermuten hat. Das Lysin ist nicht ultrafiltrierbar, also entweder selbst von bedeutender Molekulargröße, oder an Kolloide adsorbiert. Die Wirkung ist unabgestimmt, denn es lassen sich auch mit dem Typhusfiltrat Cholerakulturen klären. Gegen eine Fermentnatur spricht, daß eine Erhitzung des Filtrates auf 60, 80, ja 100° durch $\frac{1}{2}$ Std. keine Unterschiede gegen die Vergleichsröhrchen mit unerhitztem Filtrat zeigt. Versetzt man die Filtrate mit 10 Proz. Bleiazetat, oder 10 Proz. Phosphorwolframsäure, so läßt sich die Filtratwirkung nicht mehr nachweisen, ebenso nicht, wenn man mit 2proz. Essigsäure stark ansäuert und dann kocht.

Weitere Beobachtungen hat Kimmelstiel über die Wirksamkeit dieses Much-Stammes gegen Tuberkelbazillen gemacht. Die lysierenden Bazillen wurden auf Aufschwemmungen von Tuberkelbazillenkulturen geimpft. Es fand im Vergleich zu den Kontrollen eine Auflösung statt, so daß bei der Färbung mehr Muchsche Granula zu sehen waren und nach einiger Zeit nur wenig erhaltene Stäbchen. Es gelang jedoch nicht, die Tuberkelbazillen restlos aufzulösen, und Kimmelstiel erklärt das damit, daß es den Much-Bazillen an den nötigen Fermenten fehlt, die Panzerstoffe des Tuberkelbezillus anzugreifen. Die Versuche zeigen, daß der *Mycoides* nicht nur imstande ist, nicht-säurefeste Bazillen aufzulösen, sondern auch einige der nur äußerst schwierig angreifbaren Bestandteile der Tuberkuloseerreger. Um der Natur dieser lösenden Stoffe näher zu kommen, wurde auch versucht, im Blute von Tieren, die mit dem Muchschen Bazillus vorbehandelt waren, ein Antitrypsin festzustellen. Beim Kaninchen ließ sich kein solches feststellen. Beim behandelten Meerschweinchen fand sich, daß ein Serum, mit Trypsin zu gleichen Teilen gemischt, dessen verdauende Wirkung aufheben konnte. Das erscheint als Bestätigung dessen, daß der *Mycoides* ein eiweißverdauendes Ferment besitzt, mit dem er vielleicht auch auf die Zellen eines Organismus eine Verdauungstätigkeit auszuüben vermag.

In einer weiteren Arbeit hat dann Kimmelstiel ein Verfahren gezeigt, wie man den Vorgang dieser Lyse sehr gut verfolgen kann. Er impfte nämlich den *Mycoides* an die Unterseite eines Agarstückes und auf der Oberseite, also durch die Dicke der Agarschicht getrennt, verschiedene andere Stämme. Da ließ sich nun sehen, wie der *Mycoides* von unten her das Wachstum der Bazillen an der Oberfläche auslöschte und die Bazillen nur seitlich über seiner Wirkungssphäre wuchsen. Merkwürdigerweise macht der *Pyocyaneus* eine Ausnahme, indem er seinerseits den unter ihm wachsenden *Mycoides* auslöschte und ungehindert wuchs. Das hypothetische Eiweißferment des *Mycoides* muß also ihm gegenüber unwirksam sein, und umgekehrt muß er Stoffe absondern, die den *Mycoides* zu lösen imstande sind.

Was mögen das für Substanzen sein, die den *Pyocyaneus* zu diesem Vorgehen befähigen? Chemisch ist über solche Bakteriensekrete und Toxine wenig bekannt. Edwin Stanton Faust hat das Sepsin, ein bakterielles Gift, in eiweißfreiem und chemisch reinem kristallinischen Zustande erhalten. Und für andere Giftstoffe ist es gelungen, sie in einer soweit reinen Form zu erhalten, die ihre Eiweißnatur zum mindesten sehr unwahrscheinlich macht, so Jakobi das Rizin, Faust das Ophiotoxin, Abel-Ford-Schlesinger das Amanitatoxin und Amanitahämolysin. Burekhardt im Laboratorium von Edwin Stanton

Faust hat dann einen Schritt weiter getan und das Hämolyisin des *Bacterium putidum fluorescens non liquefaciens* Flüge als Dimethyloxythiolercu-säure bestimmen können. Damit war eine Tatsache mehr gefunden, die auf die große Bedeutung der Fettsäuren, besonders der ungesättigten, für alle Hämolyse und anderen lytischen Vorgänge hinweis.

Da drängt sich nun ein Gedanke auf, der das Verhalten des *Pyocyaneus* gegen den *Mycoides* merkwürdig erscheinen läßt. *Bacterium pyocyaneum* und *putidum fluorescens liquefaciens*, sowie *non liquefaciens* sind so nahe verwandt, daß man sehr wohl ähnliche Eigenschaften bei ihnen voraussetzen kann.

Wenn der *Pyocyaneus* das Wachstum des *Mycoides* aufheben, ja ihn auflösen kann, was tritt dann ein, wenn Verwandte der von Burckhardt gefundenen Stoffgruppe, also höhere Fettsäuren, den Nährflüssigkeiten zugesetzt werden, auf denen *Mycoides* und die von ihm lösbaren Bazillen wachsen.

Die Versuche wurden folgendermaßen ausgeführt: Es wurde eine Anzahl höherer ungesättigter Fettsäuren, wie die Eruca- und Brassidinsäure, die Linol- und Rizinolsäure, die Oel- und Elaidinsäure, ferner einige gesättigte Fettsäuren, wie die Myristin-, Palmitin- und Stearinsäure, dann von den niederen die Kapryl-, Kapron- und Valeriansäure, von den ungesättigten die Crotonsäure ausgewählt und davon im Verhältnis 1 : 200 kolloide Lösungen in Aqua destill. hergestellt. Dann wurden pro Säure je 8 Röhrchen mit 10 ccm steriler Bouillon genommen und den ersten 6 ansteigend der Reihe nach je 0,1, 0,3, 0,5, 0,75, 1,0 und 1,5 der Säurelösung zugesetzt.

In die letzten beiden Röhrchen kam zu Kontrollzwecken je 1,5 der verwendeten Säurelösungen. Jeweils die ersten 6 Röhrchen wurden dann mit einem *Coli*-Stamm beimpft, der früher immer von dem benutzten *Mycoides*-Stamme gelöst worden war, und dann 2 Tage im Thermostaten gehalten. Es zeigte sich, daß sie in diesen sehr verdünnten Bouillonlösungen der Fettsäuren ebensogut wuchsen, wie in den Kontrollröhrchen, die daneben ohne Fettsäuren angesetzt waren. Die Lösungen der niederen Fettsäuren lösten allerdings nach einiger Zeit die *Coli*-Kulturen wieder auf, bevor noch das *Mycoides*-Lysin in den Kontrollen seine Arbeit begonnen hatte. Umgekehrt zeigten die Kontrollröhrchen 7 und 8 an, daß die Fettsäuren auch während des ganzen Versuches in Lösung blieben und nicht etwa ausfielen, was Verwechselungen mit Bazillenwachstum hätte vortäuschen können. Nachdem diese Röhrchen also kräftig bewachsen waren, wurde auf der Oberfläche der Bouillon jedes dieser Röhrchen der *Mycoides*-Stamm eingimpft. Ebenso wurde er in jeder Säurereihe auf Röhrchen 8 eingimpft, um seine Einwirkung auf die Fettsäureverdünnungen in der Bouillon allein ohne Beimischung von *Coli*-Bazillen zu beobachten. Ueberall bildete der *Mycoides* ein gleichmäßig kräftiges Häutchen. In gleichzeitig angelegten anderen Kontrollen wuchs er auf gewöhnlicher Bouillon ebensogut wie früher, und löste auch *Coli*-Kulturen.

Aus alledem ergibt sich zunächst: Trotz des Zusatzes von höheren Fettsäuren wuchs sowohl *Coli* als *Mycoides* überall gut. Der *Mycoides*-Stamm hatte seine Lösefähigkeit erhalten. Die Fettsäuren blieben in Lösung. Auch wuchs der *Mycoides* nicht schlechter in den Säureröhrchen als für sich allein.

Seine Lösefähigkeit aber war stark verändert, sie nahm bei verschiedenen Säuren in dem Grade ab, als sie der Bouillon in immer höherer, noch nicht wachstumshemmender Konzentration zugesetzt waren. Die folgende Tabelle zeigt das im einzelnen.

Tabelle I.

Säure	Mycoides auf Colibazillen in Fettsäurebouillon						Myc. auf Fettsäurebouillon	Bouillon + Fettsäuren
Zusatzmenge	0,1	0,3	0,5	0,75	1,0	1,5	1,5	1,5
Valeriansäure	l	l	l	l	l	l	wächst wie in den Kontrollen	keine Veränderung
Capronsäure	l	l	l	l	l	l		
Caprylsäure	l	l	l	l	l	l		
Myristinsäure	l		l	l	±	±		
Palmitins	l	l	l	±	±	nl		
Stearins	l	l	l	±	nl	nl		
Crotons	l	l	l	l	l	l		
Ricinolsäure	l	l	l	±	nl	nl		
Oleins	l	l	l	l	l	±		
Elaidins	l	l	l	+	nl	nl		
Erucas	l	l	±	±	nl	nl		
Brassidins	l	l	l	±	nl	nl		
Linolsäure	l	l	l	±	±	nl		

Zeichenerklärung: l = löst, oder gelöst erhalten.
nl = löst nicht

Kontrollen: Mycoides auf Bouillon: wächst.

Cöli

Mycoides „ „ mit Cöli beimpft: löst

Man sieht also, daß die höheren Fettsäuren, besonders die ungesättigten, wie die Erucasäure die Lösefähigkeit des Mycoides-Stammes abschwächen oder aufheben, und zwar ohne in erkennbarer Weise im Bereich der angewendeten großen Verdünnungen die anderen biologischen Eigenschaften des Stammes, wie Wachstumsstärke und Form zu schädigen.

Dieses Ergebnis weist darauf hin, daß das Mycoides-Lysin wohl hauptsächlich gegen Eiweißstoffe gerichtet ist und von Fettstoffen selbst inaktiviert werden kann. Es spricht weiter dafür, daß unter den Ausscheidungsprodukten von Bakterien, wie eben den Lysinen und Toxinen auch Fettlipoidstoffe eine große Rolle spielen, wenn es auch nicht in so einfacher Weise der Fall sein wird, wie Warden, Conell und Holly in ihren Arbeiten geglaubt haben. Wohl mag der Zustand dieser Stoffe, besonders eine bestimmte Zone des Verteilungsgrades der hohen Fettsäuren wichtig sein, um wirklich in aktiver Form in biologische Vorgänge eingreifen zu können. Daneben aber sind auch Unterschiede des chemischen und sterischen Aufbaus, wie z. B. bei der S-Gruppe in dem von Burckhardt isolierten Erucasäurederivat als wesentlich anzusehen. Im Zusammenspiel beider Komponenten wird sich wahrscheinlich eines Tages die Antwort auf die Frage nach der Natur der Toxine und Lysine finden lassen.

Literatur.

Much u. Sartorius, Med. Klin. Bd. 11. 1924. — Kimmelstiel, Med. Klin. Bd. 13. 1924. — Ders., Beitr. z. Klin. d. Tuberk. Bd. 64. 1926. S. 3/4. — Burckhardt, Arch. f. exp. Pathol. und Pharm. Bd. 63. S. 107.

Nachdruck verboten.

Ein einfaches Plattenverfahren zur Züchtung strenger Anaërobier (anaërobe Bazillen — filtrierbare anaërobe Bakterien — *Spirochaeta pallida*)¹⁾.

(Aus dem Institut „Robert Koch“ in Berlin (Abt. Prof. Dr. H. A. Gins).)

Von Dr. med. vet. **Joseph Fortner.**

Mit 6 Abbildungen im Text.

Im vorigen Jahre konnte ich an dieser Stelle über die Brauchbarkeit der Ginesschen Schornsteinplatte für die anaërobe Oberflächenkultur berichten (1). Ich habe seitdem noch viele andere anaërobe Bazillen in meine Untersuchungen einbezogen, und es gelang schließlich, folgende Arten mit Sicherheit in der Gins-Platte auf Schaffbluttraubenzuckeragar zu züchten: Fränkelscher Gasbrandbazillus, Rauschbrand- und Pararauschbrandbazillus, *Bac. oedematiens*, *tetani*, *botulinus*, *histolyticus*, *putrificus verrucosus* und *tenuis*, *sporogenes* Metschnikoff und *amylobakter*. Sehr unregelmäßig dagegen und trotz reichlicher Sporenaussaat immer nur in einzelnen kümmerlichen Kolonien wuchs der *Bac. parabotulinus*; 2 weitere nicht identifizierte anaërobe Arten gingen überhaupt nicht an. Damit schien die Leistungsfähigkeit der Schornsteinplatte erschöpft zu sein. Da half folgende Beobachtung weiter: Impfte ich aus einer Bouillonmischkultur, welche den *Bac. Fraenkel* und die eine der 2 nicht identifizierten Arten — ich nenne sie hier Rasenbildner — enthielt, auf eine Gins-Platte, so wuchsen der *Bac. Fraenkel* und der Rasenbildner nebeneinander mit größter Regelmäßigkeit (s. Abb. 2). Impfte ich dagegen den Rasenbildner von einer solchen Platte, wo er leicht rein gewonnen werden konnte, auf eine weitere Gins-Platte, eventuell über eine flüssige Kultur, so ging er niemals für sich allein an. Es lag also in ersterem Falle zweifellos eine Wachstumsbegünstigung des Rasenbildners durch den *Bac. Fraenkel* vor. Daß die Wachstumsförderung nicht über den Nährboden ging, dürfte man schon daraus ersehen, daß der Rasenbildner auf der Platte seine Beweglichkeit dazu benutzte, um sich so weit als möglich aus dem Bereich der bodenständigen *Fraenkel*-Kolonie zu entfernen und sich erst im freien Gelände in dichtem Rasen ausbreitete. Der sichere Beweis war jedoch damit erbracht, daß der Versuch der Wachstumsbegünstigung ebenso gut gelang, wenn man die beiden Arten auf ein und dieselbe Platte nebeneinander ausspatelte und durch Ausschneiden eines breiten Agarstreifens isolierte. Die Wachstumsförderung ist nur so zu erklären, daß in der Schornsteinplatte der *Fraenkelsche* Bazillus den Sauerstoff noch weitgehender zu absorbieren vermag, als die gleichzeitig wirkende alkalische Pyrogallollösung. Diese Eigenschaft ist aber nicht auf den *Fraenkel*-Bazillus beschränkt, alle anderen oben genannten anaëroben Arten, die ich daraufhin systematisch untersuchte, förderten in stärkerem oder geringerem Grade die jeweils schlechter und langsamer wachsenden Arten. Keine jedoch erreichte den schnell und üppigwachsenden *Bac. Fraenkel* an Wirksamkeit.

Diesen Beobachtungen schloß sich nun folgende Ueberlegung an: Setzt man unter Weglassung des alkalischen Pyrogallolgemisches an die Stelle des

1) Vortrag, gehalten in der Berliner Mikrobiologischen Gesellschaft am 13. 2. 28.

streng anaëroben Sauerstoffzehrers, z. B. des Fraenkel-Bazillus, einen fakultativen Anaërobier, der im aëroben Anfangszustand ebenso gedeihen kann wie in dem durch Fernhalten der Außenluft und durch fortschreitenden Sauerstoff-



Fig. 1. Blutagarplatte durch ausgeschnittenen Agarstreifen geteilt; die untere Hälfte zeigt einen dichten Rasen des Sauerstoffzehrers, des *Bac. prodigiosus*, die obere Hälfte den zu züchtenden strengen Anaërobier, hier *Bac. botulinus*. Die Kulturen sind gleichzeitig 20 Std. bei 37° bebrütet.

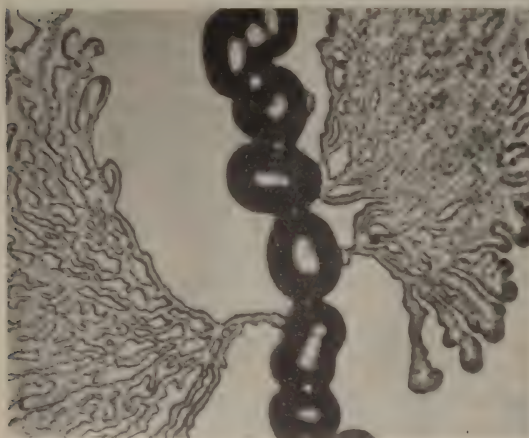


Fig. 2. 1täg. Mischkultur auf Blutagar in der Ginsschen Schornsteinplatte; die geschlossenen Kolonien gehören dem *Bac. Fraenkel* an, die wurzelförmigen dem sogenannten Rasenbildner.

verbrauch entstehenden anaëroben Zustand, so muß die gleiche Wirkung erzielt werden können. Ich nahm als fakultative Anaërobier den *Bac. coli*, den *Bac. prodigiosus* und den *Bac. proteus*. Meine Ueberlegung erwies sich im Experiment als richtig, die Ergebnisse waren sogar über alles Erwarten hinaus sehr günstig.

Praktisch nehme ich also eine Petri-Schale mit Traubenzuckerblutagar, zweckmäßigerweise eine sehr flache, teile z. B. den Nährboden durch Ausschneiden eines Agarstreifens in 2 Hälften, beimpfe gleichzeitig die eine Hälfte mit dem fakultativen Anaërobier, wobei ich sehr dicht ausspatele, um einen zusammenhängenden Rasen zu bekommen, die andere Hälfte mit dem strengen Anaërobier und verschließe mit einem Plastilinring (s. Fig. 1). Die Sauerstoffzehrung durch die fakultativen Anaërobier ist nun so schnell und so weitgehend, daß bei 37° nicht nur die Arten, die auch auf der gewöhnlichen Gins-Platte gedeihen, üppig wachsen, sondern auch jene Arten, die bisher auf der Gins-Platte nur in Symbiose mit dem Fraenkel-Bazillus wuchsen. Dabei setzt das Wachstum schneller ein; Arten, wie z. B. der Tetanusbazillus oder Botulinusbazillus zeigen im Gegensatz zur Schornsteinplatte bei meinem Verfahren schon nach 24 Std. gute Koloniebildung. Im übrigen bestehen zwischen der Schnelligkeit des Wachstums einerseits

und dem Luftraum über dem Nährboden und der Fläche des Sauerstoffzehrers andererseits rein quantitative Verhältnisse. Man kann übrigens auch 2 nähr-

bodentragende Unterschalen, von denen die eine mit dem Sauerstoffzehrer, die andere mit dem strengen Anaeröbier beschickt ist, die Nährböden einander zugewendet, mit Plastilin verschließen. Die Nährböden sind vor der Beimpfung gut zu trocknen, etwa 1 Tag bei 37°.

Ich habe nun weiterhin jene Gruppe der streng anaeroben filtrierbaren Bakterien, deren bekanntester Vertreter das *Bact. pneumosintes* ist, in den Versuch einbezogen. Herr Kollege Levinthal hat mir das *Bact. pneumosintes* und 2 weitere Arten, J I und J II bezeichnet, zur Verfügung gestellt.

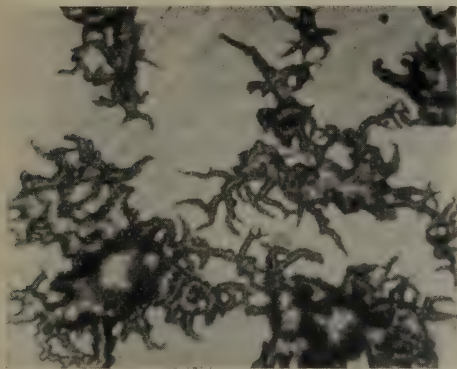


Fig. 3. 3täg. Oberflächenkolonien des Tetanusbazillus (Stamm „Höchst“) auf Schafbluttraubenzuckeragar.

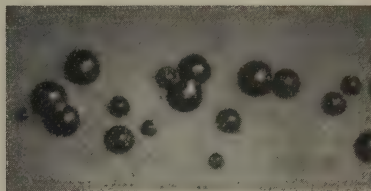


Fig. 4. 3täg. Oberflächenkolonien des *Bacterium pneumosintes* auf Schafbluttraubenzuckeragar.

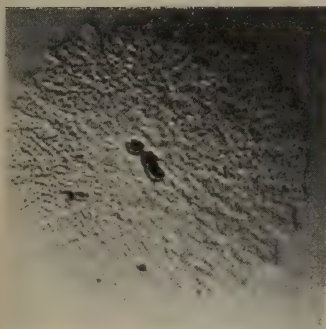


Fig. 5. 9täg. Oberflächenkolonie der *Spirochaeta pallida* auf Kaninchenblutagar.

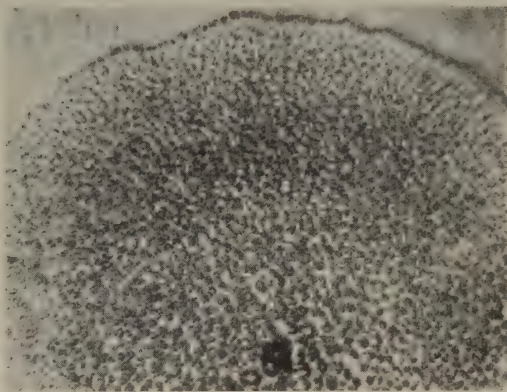


Fig. 6. 16täg. Oberflächenkolonie von *Spirochaeta pallida* auf Kaninchenblutagar.

Die Fig. 2—6 sind mit der Mikrokamera „Leitz“ bei auffallendem Licht der Bogenlampe mit 10facher Vergrößerung aufgenommen. Die Kulturen sind, ausgenommen Fig. 2, in der mit Plastilin luftdicht verschlossenen flachen Petri-Schale mit dem *Bac. prodigiosus* als Sauerstoffzehrer gezüchtet (bei 37°).

Es gelang mir nun mühelos, diese 3 Arten nach dem oben geschilderten Verfahren mit *Bac. coli* und *Bac. prodigiosus* zu züchten. (Den *Bac. proteus* habe ich von jetzt an als nicht so gut brauchbar nicht mehr benutzt). Die sichtbare Koloniebildung — bei Ueberimpfung aus Leberbouillon wie von

Platte zu Platte — setzt etwa am 2.—3. Tage ein und ist üppiger auf Schafbluttraubenzuckeragar als auf gewöhnlichem Kaninchenblutagar. Die Amerikaner benötigen bekanntlich zur Züchtung dieser Gruppe den reichlich komplizierten Brownschen Apparat.

Dieser Erfolg ermutigte mich nun ferner, auch meine bisher immer negativ verlaufenen Versuche, die *Spirochaeta pallida* auf der Oberfläche zu züchten, mit dem neuen Verfahren wieder aufzunehmen. Mir stand ein Kulturspirochätenstamm (Ficker-Wassermann Nr. 36) zur Verfügung, den mir Herr Prof. Reiter vor einigen Jahren überlassen hatte, und den ich seitdem in Leberbouillon (Pferdefleischbouillon und Kaninchenleber, im Autoklaven zu sterilisieren und vor der Beimpfung aufzukochen) unter Vaselinesiegel fortzüchtete.

Um es kurz zu sagen, auch die *Spirochaeta pallida* wuchs auf der Oberfläche des Kaninchenblutagars mit dem *Bac. prodigiosus* als Sauerstoffzehrer sowohl bei Beimpfung aus Leberbouillon wie von Platte zu Platte. Die Kombination: Kaninchenblutagar (ohne Traubenzucker) + *Prodigiosus* scheint Vorbedingung für einen guten Kulturerfolg zu sein. Die Bildung sichtbarer sehr charakteristischer Oberflächenkolonien setzte etwa nach 1 Woche ein. Die *Spirochaeta pallida* ist meines Wissens bisher nur einmal auf der Oberfläche gezüchtet worden, und zwar von Gates (2) im Rockefeller-Institut mit Hilfe des Brownschen Apparates. Versuche, die *Spirochaeta pallida* direkt aus dem Hodensyphilom des Kaninchens zu züchten, werden in nächster Zeit vorgenommen. (Es folgt eine Demonstration von Lichtbildern von Oberflächenkulturen sämtlicher angeführten anaëroben Arten. Die in der vorliegenden Veröffentlichung wiedergegebenen Bilder stellen nur eine kleine Auswahl dar.)

Zum Schluß möchte ich noch kurz auf die einschlägige Literatur eingehen. Die Versuche, in flüssiger Kultur strenge Anaërobier in Symbiose mit Aërobiern zu züchten, sind zahlreich, ich will sie jedoch hier übergehen, zumal diese Verfahren schon seit langem nur noch eine untergeordnete Bedeutung besitzen. Auch das Verfahren von Kitasato (3), Kedrowski (4), Scholtz (5), Weigmann (6) und anderer, auf der Oberfläche ohne jeden Luftabschluß in den Aërobenkolonien (also nicht neben ihnen) Tetanusbazillen oder Fraenkel-Bazillen zu züchten und ihre Vermehrung mikroskopisch im Ausstrich zu verfolgen, unterscheidet sich nicht prinzipiell von der flüssigen Mischkultur und ist praktisch belanglos. Am nächsten kommt dem von mir angegebenen Verfahren eine Methode, die zur Züchtung des *Abortusbazillus* Bang angewendet wird. Der *Abortusbazillus* hat bekanntlich 2 Wachstumsoptima: das eine liegt bei einer Sauerstoffspannung, die 5mal höher ist, als die der uns umgebenden Luft, das andere liegt etwa unterhalb der normalen Sauerstoffspannung. Viele Stämme wachsen aber auch schon bei gewöhnlicher Spannung, wenn nicht schon bei der ersten Anzüchtung aus dem abortierten Fötus, so doch bei ein- oder mehrmaliger Umzüchtung. Er ist also ein aërober Bazillus, wie von Ostertag und Zwick (7) auf Grund eigener Untersuchungen ihn bezeichnen. Jedenfalls kann er nach Zwick und Wedemann (8) bei den niedrigen Sauerstoffspannungen, wie sie durch das Kalilauge-Pyrogallolverfahren (Lentz-Platte) erzielt werden, nicht mehr gedeihen. Um nun gleich bei der ersten Anzüchtung sämtliche Stämme zu erfassen, hat Nowak (9) folgendes Verfahren angewendet: Er stellt die mit *Abortusbazillen* beimpften Schrägröhrchen gemeinsam mit ein oder mehreren Schrägröhrchen, die mit dem *Bac. subtilis* beschickt sind, in ein Glasgefäß, das daraufhin luftdicht abgeschlossen wird. Der *Bac. subtilis* zehrt den Sauerstoff soweit auf, daß die *Abortusbazillen* wachsen können. Nowak glaubte, damit eine milde Sauerstoffabsorption anzuwenden, wie es

auch tatsächlich bei seiner Versuchsanordnung — geringe Subtilisfläche, großer Luftraum — der Fall war. Durch allmähliche Verringerung der Subtilisfläche konnte dann Nowak den Abortusbazillus an die gewöhnliche Sauerstoffspannung gewöhnen.

Man sieht jedenfalls, das Prinzip der Sauerstoffzehrung durch eine aërobe Oberflächenkultur ist hier angewandt, der Umstand jedoch, daß das an einem ganz ungeeigneten Objekt, nämlich dem aëroben Abortusbazillus, geschah, hat die große Bedeutung nicht erkennen lassen und die weitere Anwendung verhindert. Interessant ist ferner noch, daß die theoretischen Grundlagen meines Verfahrens schon längst geklärt sind. Vor 35 Jahren hat Hesse (10) im Laboratorium des bekannten Gasanalytikers Hempel nachgewiesen, daß die Oberflächenkulturen von gewissen Aërobiern, wie des Typhusbazillus und des Milzbrandbazillus, im geschlossenen Gefäß den Sauerstoff bis zum letzten Atom wegnehmen, und daß der sauerstofflose Zustand tagelang andauert, ohne daß die Kulturen zugrunde gehen. Eine praktische Nutzenanwendung für die Züchtung strenger Anaërobier ist aus dieser Feststellung aber niemals gezogen worden.

Als Ergebnis meiner Versuche darf ich nun kurz zusammenfassen: Es gelingt in einer gewöhnlichen Petri-Schale, die luftdicht mit Plastilin verschlossen ist, die strengsten Anaërobier auf der Oberfläche in Reinkultur zu züchten, wenn ein Teil des Nährbodens mit einem fakultativen Anaërobier beimpft ist, der den Sauerstoff des Luftraums verzehrt.

Nachtrag bei der Korrektur. Als Sauerstoffzehrer wird jetzt allgemein nur noch der *Bac. prodigiosus* verwendet. Der *Pallida*-Stamm Nr. 36 (Reiter) wurde bis jetzt durch 9 Plattenpassagen geführt. Außerdem wurden ein weiterer *Pallida*-Stamm (Nr. 22 von Dr. Kroò in Reinkultur zur Verfügung gestellt) und ein Stamm von *Spirochaeta dentium* (Reiter) in mehreren Passagen auf der Kaninchenblutplatte gezüchtet.

Literatur.

- 1) Fortner, J., Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 86. 1927. S. 379. — 2) Gates, F. L., Journ. of exper. Med. Vol. 37. 1923. p. 311. — 3) Kitasato, Ztschr. f. Hyg. Bd. 7. 1889. S. 225. — 4) Kedrowski, W., Ebenda. Bd. 20. 1895. S. 358. — 5) Scholtz, W., Ztschr. f. Hyg. Bd. 27. 1898. S. 152. — 6) Weigmann, Münch. med. Wochenschr. 1925. S. 1332. — 7) von Ostertag u. Zwick, Handbuch der path. Mikroorganismen von Kolle-Wassermann. 2. Aufl. Bd. VI. 1913. S. 298. — 8) Zwick u. Wedemann, Arb. a. d. Kais. Gesundheitsamt. Bd. 43. 1913. S. 130. — 9) Nowak, Ann. de l'Inst. Pasteur. T. 22. 1908. p. 541. — 10) Hesse, W., Ztschr. f. Hyg. Bd. 15. 1893. S. 17.

Nachdruck verboten.

Beitrag zur Konservierung von Bakterienkulturen mit Paraffin.

Von Universitätsdozent Dr. **J. v. Darányi**, Oberbakteriolog, Budapest.

Mit 1 Abbildung im Text.

Die bakteriologischen Untersuchungsanstalten sind oft genötigt, Bakterienkulturen zu diagnostischen und Forschungszwecken aufzubewahren. Um die Bakterien längere Zeit lebend zu erhalten, pflegt man sie gewöhnlich jeden Monat zu überimpfen. Empfindlichere Arten sind sogar noch öfter auf frische Nährböden zu bringen. Bei größeren Sammlungen bedeutet es daher eine ziemlich große Arbeit, so daß die Aufrechterhaltung einer solchen manchmal ein besonderes Personal erfordert. Bei öfterem Ueberimpfen der Kulturen ist dabei vielfache Gelegenheit zu Verunreinigungen mit fremden Keimen gegeben. Außerdem verlieren die Bakterien, wenn oft überimpft, leicht die Virulenz und andere Eigenschaften, z. B. die Antigenwirkung. Den Verlust der Agglutinabilität habe ich während des Krieges besonders bei Paratyphusbazillen öfters beobachtet, wenn sie längere Zeit auf künstlichen Nährböden fortgezüchtet waren. Dabei blieb die Agglutinabilität bei der alten, mehrere Monate nicht überimpften Kultur desselben Stammes noch gut erhalten. Es zeigt sich also, daß man möglichst dahin trachten muß, die Stämme ohne häufige Ueberimpfungen lange am Leben zu erhalten.

Das Leben der Kulturen wird durch das Licht, durch das Oxygen der Luft und besonders durch Austrocknung gefährdet. Bei festen Nährböden bietet im allgemeinen die Austrocknung die größte Gefahr der Lebenderhaltung der Kulturen. Es wäre daher das einfachste, die Bakterien in flüssigen (z. B. Bouillon) oder breiigen (z. B. Hirnbrei) Nährböden aufzubewahren. Die Verunreinigung mit fremden Bakterien geschieht aber bekanntlich in flüssigen Nährböden viel leichter als in festen. Im Hirnbrei ist dabei das Wachstum wegen der Undurchsichtigkeit des Nährbodens überhaupt nicht wahrzunehmen. Auch für die Erhaltung der Virulenz und Lebensfähigkeit bewährten sich die flüssigen und breiigen Nährböden nicht besonders gut, da in denselben sich die schädlichen Stoffwechselprodukte besser anhäufen. Hiblers Hirnbrei gestattet nach 3—18 Monaten Subkulturen, was also keinen besonderen Vorteil für die Konservierungsdauer bedeutet (Hach, Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. I. Orig. Bd. 102. Heft 1/3).

Im Lister-Institut in London verwendet man zur Aufbewahrung Gelatine, was aber auch keine besondere Vorteile hat. Fast alle Sammlungen benützen daher lieber Agar-Agar-Nährböden. Das Zerschmelzen des Reagenzglases ist wegen der Schwierigkeit des Oeffnens nicht zu empfehlen. In dem Králschen bakteriologischen Museum in Wien werden die Kulturen mit Siegellack verschlossen. Die Entfernung des Siegellackes ist aber immer etwas schwierig und macht eine Ueberimpfung in 2—3 Monaten nicht überflüssig. Der Verschuß mit Gummikappen schützt nicht ganz vor Verschimmelung und auch nicht absolut sicher vor Austrocknung wegen des Sprödewerdens des Gummi. Die neuerlich viel verwendete Guttapercha-Abschließung ist auch nicht sicher. Die Handhabung des paraffinierten Watteverschlusses ist auch etwas schwierig und ist dieser ziemlich unsicher sowohl gegen Schimmelpilze als auch gegen

Austrocknung. Gegen Austrocknung habe ich die Kulturen anfangs in Konservengläsern aufzubewahren versucht, doch tritt bei dieser Methode leicht eine Verschimmelung der Kultur auf.

Das Ziel der Konservierung ist eine luftdichte Abschließung, um eine Austrocknung und Verunreinigung zu verhindern. Von allen Konservierungsverfahren hat sich die Anwendung von Paraffinum liquidum auf der Nährbodenoberfläche am besten bewährt. Die Kulturen sind auf diese Weise unter der Paraffinschicht vor Verunreinigung und Austrocknung am besten geschützt.

Lumière und Chevrotier (Compt. rend. Ac. d. Sciences. 1914. p. 1820) überschichteten flüssige Nährbodenkulturen mit Vaselineöl. Ungermann (Arb. kais. Ges. A. 51. 1918. S. 180) hat bei 60° C sterilisiertes Kaninchenserum mit Paraffinüberschichtung als Dauersubstrat für empfindliche Bakterienarten benützt. Bei ganz empfindlichen Keimen (Gono-, Meningokokken, Influenzabazillen usw.) kann das Ungermannsche Verfahren wohl Anwendung finden. Da indes das Arbeiten auf festen Nährböden vorteilhafter ist, hat Michael auf Grund der Ungermannschen Methode eine Ueber-schichtung des festen Nährbodens mit Paraffin zuerst angegeben (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 86. S. 506). Die dabei beschriebene Technik ist aber wegen der Schwierigkeit der Abimpfung und der Art der Gewinnung von sterilem Paraffin im Autoklav noch nicht ganz vollkommen. Michael überschichtet dabei gewöhnlich nicht die ganze Agaroberfläche, wodurch eine Austrocknung doch in mehreren Monaten erfolgen kann. Dabei müßte man beim Ueber-schichten der ganzen Oberfläche bei einer richtigen Ueberimpfung zuerst das Paraffin vom Nährboden entfernen. Dikomeit (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 101. Heft 4/5. S. 290) empfiehlt, lebende Kulturmasse an die Innenfläche von sterilen Röhren zu bringen und nachher mit Lanolinparaffin zu überschichten.

Ich habe das Paraffinkonservierungsverfahren an festen Nährbodenkulturen nachgeprüft. Die Abimpfung gestaltet sich aber sowohl bei dem Michaelschen als auch bei dem Dikomeitschen Verfahren ziemlich schwierig. Ich verwandte daher eine eigene Technik, bei der die Abimpfung gar keine Schwierigkeiten mehr bietet:

Man läßt die Agar- oder Serumnährböden in Reagenzröhrchen derart erstarren, daß die Oberfläche des Nährbodens in einem Winkel von 45° steht (s. Fig. 1). Eine Dauerkultur kann immer leicht angelegt werden, wenn wir den vorhandenen gewöhnlichen Schrägagar schmelzen und dann bei einer Neigung von 45° erstarren lassen. Auf solche Nährböden bringt man die abzuimpfende Kulturmasse. Nach der Entwicklung des Bakterienrasens wird die Agaroberfläche mit sterilem Paraffin überschichtet, so daß die ganze Agarfläche mit dem Paraffin ganz bedeckt und sogar einige Millimeter noch überragt wird. Steriles Paraffin hält man in sterilen, mit Watte verschlossenen Reagenzgläsern immer bereit. Der Verbrauch an Agar und Paraffin ist bei diesem Verfahren sehr gering. Die Abimpfung erfolgt mit gewöhnlicher Platinöse, und ohne daß die Entfernung des Paraffins notwendig wäre.

Die Abimpfung geht folgendermaßen vor sich: Man hält das Röhrchen beinahe horizontal, mit der Agarschicht nach unten, so daß das nach unten ausweichende Paraffin die

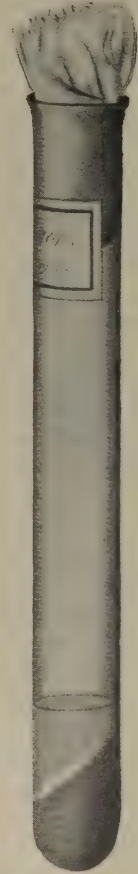


Fig. 1. Kultur mit Paraffinabschluß.

Oberfläche freiläßt, von welcher man nun mit der Oese leicht abimpfen kann. Als Paraffin benutzen wir am besten Paraffinum liquidum puriss. Merck. Im Gegensatz zu Michael erfolgt die Sterilisierung des Paraffins nicht im Dampftopf, da es hierdurch mit Feuchtigkeit vermischt wird und sich beim Abkühlen trübt. Das in Reagenzröhrchen gegebene und mit Watte verschlossene Paraffin wird am besten bei 120—140° C 1½—2 Std. im Heißluftapparat sterilisiert. Die Reinigung der gebrauchten Reagenzgläser von dem Paraffin erfolgt am besten mit trockenem Sand.

Die Lebensfähigkeit der Kulturen unter Paraffinverschluß war in meinen Versuchen bedeutend verlängert. Die Lebensdauer auch der empfindlichsten Bakterien (Gono-, Meningokokken, Influenzabazillen) ist unter Paraffinverschluß bedeutend länger als ohne diesen, wie schon Michael nachgewiesen hat. 2 Stämme von Pneumokokken waren in meinen Versuchen noch nach 3 Monaten lebensfähig (nach 8 Monaten aber abgestorben). Rotlaufbazillen, *B. chol. gall.*, *B. abortus* Bang, Streptokokken, Diphtheriae hominis-Kulturen, die sich in der gewöhnlichen Weise nach 2 Monaten kaum mehr überimpfen lassen, zeigten bei Paraffinverschluß noch nach ½ Jahre Wachstum, womit ich die Michaelschen Angaben bestätigen kann. Das *B. pyocyaneum* geht auch ohne Ueberimpfung schnell (in 2—3 Monaten) zugrunde, war aber unter Paraffin noch nach 1 Jahre lebend. Kulturen von Typhus-, Dysenteriebazillen zeigten beim Abimpfen nach 1 Jahre noch einen mehr oder weniger zusammenhängenden Rasen. Das Wachstum von *Coli* und *B. paratyphi B* war noch nach 1 Jahre unverändert. Die Sporenbildner müssen auf diese Weise offenbar auch mehrere Jahre überdauern. Haben doch im allgemeinen die Bakterien eine gewisse natürliche Lebensdauer, nach welcher sie, falls sie sich nicht vermehren, absterben. Diese Lebensdauer ist bei Typhus ca. 1 Jahr, bei *Coli*, *Pyocyaneum*, Sporenbildnern usw. noch viel größer. Es ist also eine unendliche Konservierung auch mit Paraffin nicht möglich. Die Kulturen müssen daher innerhalb eines Jahres auch bei der besten Konservierungsmethode überimpft werden. Meine Resultate sind im allgemeinen etwas günstiger, als die mit dem Michael- und Dikomeitschen Verfahren, was mit dem vollständigeren Abschluß bzw. der Verwendung von Nährsubstrat (und nicht antrocknen!) zu verdanken ist.

Ich habe auch betreffs der Virulenzerhaltung Untersuchungen angestellt. Rotlaufbazillen töteten, von der 3monatigen Paraffinkultur auf Agar abgeimpft, in 1₂₀ Normalöse Mäuse nach 3 Tagen. Aehnlich verhielt sich auch ein frisch gezüchteter Stamm. Die Paraffinkonservierung wäre aber außer der Virulenz- auch zu Antigenkonservierung (Agglutinogen, Präzipitogen usw.) zu verwenden, was bei Milzbrand, Rotlauf, Staphylokokken, Streptokokken, Typhus, Dysenterie, Mäusetyphus, Cholera usw. von großer Wichtigkeit ist. Dieses Verfahren ist auch für die Züchtung von Anaërobiern sehr geeignet. So gelang es mir, Tetanus-Fränkel-, Oedema malignum-, Rauschbrandbazillen zu bebrüten und Reinkulturen aufzubewahren. Es eignet sich aber weniger zur Isolierung von anaëroben Kolonien als zur Weiterzüchtung.

Auf Grund meiner Untersuchungen empfehle ich, die empfindlicheren Arten (*Chol. gall.*, Diphtherie, Abortus, Rotlauf) in 4, die resisteren Bakterien (Typhus, Dysenterie, Paratyphus usw.) in 8, noch resistentere Keime (*Coli*, *Pyocyaneus*, Staphylokokken usw.) nach 1—1½ Jahren zu überimpfen.

Nachdruck verboten.

Morphologie und Biologie der Larve von *Gastrophilus pecorum*.

Von **A. und M. Hobmaier**, Dorpat.

Mit 1 Tafel.

Die Larven von *Gastrophilus* haben ihren Namen „magenliebend“ erhalten, weil ihr bevorzugter Aufenthaltsort die Schleimhaut des Magens ist. Diese Bezeichnung mag für *G. equi*, *G. haemorrhoidalis* und *G. pecorum* zutreffend sein. Bei *G. nasalis*, der ein Bewohner des Duodenums ist, verliert der Name seine Bedeutung. Alle 4 Arten stellen Schmarotzer der Equiden dar. Nur *G. pecorum* kann den Angaben zufolge seine Entwicklung auch in Boviden durchlaufen. Aberrate erwachsene *Gastrus*-Larven werden gelegentlich bei Raubtieren vorgefunden. Es dürfte sich hierbei um keine eigentliche Entwicklung, sondern nur um eine mechanische Verpflanzung der erwachsenen Larven in die Magenöhrlung dieser Tiere mit der Nahrung handeln. Wiederholte Versuche der Autoren die verschiedenen *Gastrus*-Larvenarten im Magen des Hundes zu dauernder Anheftung zu bringen, verliefen negativ. Beim Menschen, — insbesondere liegen zahlreiche Fälle aus Rußland vor, — sind oftmals erste Jugendstadien von *Gastrophilus*-Arten beobachtet worden. Neuerdings hat Prof. Blessig (Dorpat) Gelegenheit gehabt, eine in das Auge eines Kindes eindringende Larve operativ zu entfernen (mündliche Mitteilung). Bedauerlicherweise fehlt uns die sichere Kenntnis, um welche *Gastrus*-Larvenarten es sich in obigen Fällen gehandelt hat. Die Morphologie der jüngeren Entwicklungsstadien der einzelnen *Gastrophilus*-Arten ist zurzeit noch nicht näher ermittelt, so daß ihre gegenseitige Unterscheidung auf Schwierigkeiten stößt. Lediglich über das reife Larvenstadium, die Puppe, die Imagines, ihre Eier und die darin sich entwickelnde junge Larve liegen Bearbeitungen vor. Durch die Angaben von Brauer, Numan, Gujot u. a. erscheint zwar gesichert, daß alle *Gastrus*-Larvenarten sich in 3 Stadien entwickeln, aber für keine der 4 *Gastrus*-Arten sind nähere Angaben bezüglich des 1. und 2. Stadiums übermittelt. Daraus erklärt sich auch die Unsicherheit bezüglich der Feststellung des Wanderungsweges der einzelnen Arten im Tierkörper. Auf die bedeutende Schwierigkeit, die winzigen ersten Larvenstadien im Körper des Pferdes aufzufinden, braucht lediglich verwiesen zu werden. Der Umstand, daß kaum je ein Pferd mit nur einer *Gastrus*-Larvenart befallen ist, sondern meist gleichzeitig mit mehreren und daß außerdem die Jugendformen nur zu bestimmten Zeiten angetroffen werden können, steigert die angedeuteten Schwierigkeiten beträchtlich. Die Autoren haben sich die Aufgabe gestellt, die einzelnen Entwicklungsformen der 4 *Gastrus*-Larvenarten morphologisch und biologisch klarzustellen. Diese Arbeit wurde kürzlich abgeschlossen. Vorstehend teilen sie zunächst ihre Ergebnisse bezüglich *Gastrophilus pecorum* mit. Gezwungen durch den Umstand, daß sie zurzeit von der wichtigsten Literatur über den Gegenstand abgeschnitten sind, stützen sie sich dabei so gut wie ausschließlich auf ihre eigenen Feststellungen.

I. Erstes Stadium der Larve bis zur Häutung.

Die aus dem Ei kommende Larve ist ca. 1,2 mm lang. Die jüngsten von uns im Tierkörper gefundenen Formen dieses Stadiums hatten eine Länge

von 3 mm bei einer Breite von 0,6 mm. Die größten Larven waren 4,5 mm lang und 1 mm breit. Die Larve weist demnach bedeutende Größenunterschiede im Verlaufe des 1. Entwicklungsstadiums auf. Ihre ursprüngliche Form bleibt dabei durchaus gewahrt. Sie ist schlank, nach vorne und hinten sich verjüngend. In der Höhe des 6. Segmentes erreicht sie ihre größte Breite. Zunächst noch, abgesehen von der Bedornung, glashell, rötet sie sich mit der Größenzunahme allmählich von ihrem Hinterende aus. Die 2 beweglichen, freien Atemröhren an ihrem Hinterende bleiben bestehen. Sie sind zu zwei Drittel in den Körper zurückziehbar. In Ruhestellung überragen sie an $100\ \mu$ das letzte Segment. Zur Ausbildung zu Atemöffnungen im Vorderende der Larve kommt es nicht. Der Mundhakenapparat ist schlank, von großer Zartheit, völlig dem der Eilarve gleich. Seine Farbe erscheint, wie auch die der Kopfdornen, schwarz. Die Rückenseite des Kopfendes ist mit 3 Reihen kleiner Dornen bestachelt. Seine Bauchseite weist neben einer oberen Reihe größerer, 5 Reihen kleinerer Dornen auf. Die Körperdornen stehen in je 2 Reihen an den Vorderenden der Segmente. Die der oberen Reihe sind jeweils größer, $100\text{--}140\ \mu$ messend, von brauner Grundfarbe mit schwarzbrauner Spitze. Die der unteren Reihe hingegen sind kleiner und schwarz. Im vorderen Teil der Larve messen sie $17\text{--}20\ \mu$, in den letzten Segmenten nur $9\text{--}10\ \mu$. Bei der jugendlichen Larve stehen die krallenförmig gekrümmten Körperstacheln dicht nebeneinander gereiht und sie erscheinen hier wesentlich kleiner. In der Ansicht von oben stellen sie gestreckte, zapfenförmige Bildungen dar. Mit dem Wachstum der Larve treten sie weiter auseinander und stärker aus der Kutikula hervor. An der Larve sind 13 Segmente unterscheidbar. Segment 1 und 2 erscheinen noch deutlich voneinander abgesetzt und gestatten eine große Beweglichkeit des Vorderendes der Larve. Ihre Rückenbedornung ist die folgende: Im 3. Segment jederseits in der oberen Reihe 4 große Stacheln, darunter zwischen ihnen je 2 kleine Dornen. In der Rückenmittellinie besteht eine kleine Lücke. — Im 4. Segment jederseits 5 große Dornen mit dazwischen und darunter stehenden Paaren kleiner Stacheln. In Rückenmittellinie besteht wieder eine dornenfreie Aussparung. Im 5. Segment trifft man beiderseits 5—6 große Stacheln, darunter wieder in den Zwischenräumen je 2 kleine Dornen. Die Rückenmittellinie bleibt frei. Das 6. Segment weist in der 1. Dornenreihe beiderseits je 5 Stacheln auf, 2. Dornenreihe in den Zwischenräumen unter ihnen einfach. Wiederum Aussparung der Mittellinie. Auch im 7., 8., 9. und 10. Segment bleibt untere Reihe einfach. An großen Dornen der oberen Reihe finden sich im 7. Segment 4—5, im 8. Segment 3—4, im 9. Segment 3—4 und im 10. Segment 2—3. Vom 7. Segment an rücken die Stacheln nach der Seite mehr zusammen, so daß die Aussparung der Rückenlinie nach rückwärts ständig an Breite zunimmt. Im 11. Segment fehlen die großen Dornen der 1. Reihe bereits völlig. Vorhanden sind nur noch jederseits 2 kleine Stacheln der 2. Reihe. Segment 12 und 13 erscheinen nackt.

An der Bauchseite sind 3.—10. Segment einschließlich zweireihig bedornt. Die obere Reihe führt wieder die größeren Stacheln, die untere dazwischenstehende Reihe die kleineren. Eine Aussparung in der Bauchmittellinie liegt nicht vor. Im 11. Segment ist der Größenunterschied zwischen der oberen und unteren Reihe gering. Außerdem ist die Besetzung mit Stacheln schwächer, indem sich insgesamt nur ca. 8 vorfinden. Das 12. und 13. Segment entbehrt jeder Bedornung.

Bei einer Größe von 4 mm bereitet sich die Larve zur Häutung vor. Allmählich wird dann das 2. Larvenstadium eingeschlossen in der Larvenhaut des 1. Stadiums sichtbar. Die neue Larve erfüllt den ganzen Binnenraum der Haut mit Ausnahme des 13. Segmentes. Zunächst noch kaum zu erkennen,

wird mit der Bräunung einzelner Chitintteile die neue Larve schließlich in allen Einzelheiten erkennbar. Wenn auch ihre Leibesringe infolge der beengten Lagerung stark zusammengeschoben sind, so lassen sich nunmehr doch bereits alle Gleichheiten und Unterschiede zwischen dem 1. und 2. Stadium der Larve in dem vorliegenden Deckbilde ablesen. Die im Vergleich zum 1. Stadium mächtig entwickelten Kopfhaken der 2. Form liegen eingezogen im Kopfe der Larve, in ihrer Längsachse dicht aneinander gelegt. Diese Stellung wird bei der freien Larve nicht wiedergefunden, sie ist bedingt durch die Raumeenge. Unter dem 12. Segment schimmert bereits die Vereinigung der Atemröhre als eine Stigmenplatte mit je 2 Arkaden hervor. Auch die Dornenreihen der neuen Larve werden schließlich in allen Einzelheiten sichtbar, wenn auch der Ueberblick durch die Zusammenpressung der Larve erschwert ist. Den Akt des Verlassens der Larvenhaut selbst konnten wir nicht beobachten. Es ist uns auch nicht gelungen, eine unversehrte, abgestoßene Larvenhaut zu präparieren. Wir glauben indes nicht fehl zu gehen in der Annahme, daß die Larve des 2. Stadiums in ähnlicher Weise die Haut des 1. Stadiums verläßt, wie wir dies später vom 3. Stadium beim Abgang aus der Haut des 2. Stadiums schildern werden.

II. 2. Stadium der Larve bis zur Häutung.

Die jüngsten Larven des 2. Stadiums waren 5,1 mm lang und 1,2 mm breit. Die ältesten erreichen eine Größe von 12 mm bei 3 mm Breite. Die Farbe wird allmählich blutrot, vom Hinterende nach vorne vorschreitend. Die Spindelform des Körpers verliert sich. Im Bereiche der letzten Segmente tritt eine starke Anschwellung auf, wodurch die spätere Madenform der Larve hervorgerufen wird. An Stelle der 2 freien Atemröhren ragt aus dem letzten Segment die gemeinsame Stigmenplatte hervor. Sie ist zunächst noch abstehend, sinkt aber mit der Ausdehnung des letzten Segmentes immer mehr auf dieses herab und ruht schließlich auf ihm. Die Stigmenplatte ist nach rückwärts gekrümmt, ihre Höhlung zum Körper gerichtet und schief gestellt, mit einer Neigungsachse von vorne und oben nach hinten und unten. Zu Beginn des 2. Stadiums ist sie also noch von einer gewissen Beweglichkeit, später nimmt diese aus dem angegebenen Grunde ab, und es bildet sich durch 2 kleine, quergestellte Kutikularfalten eine Art Bursa aus, die den Zugang zu den Atemöffnungen abschließen kann. Die obere Falte trägt eine einfache Reihe kleiner Dornen, die untere ist mit mehreren Dörnchenreihen ausgestattet. Aeußerlich betrachtet, gleicht der Chitinrahmen der 2 Atemöffnungen in der Form eines vereinigten Doppelovals dem des letzten Stadiums. Er ist indes entsprechend kleiner und zarter. Seine Höhe beträgt 0,5 mm, seine Breite 0,7 mm. Jede Atemöffnung weist 2 Arkaden auf. Sie sind bogenförmig nach außen gekrümmt. Die innere mißt 380 μ , die Querleisten der Arkaden werden von Chitinringen gebildet. Ihre Zahl schwankt. Im Durchschnitt 13—14, wobei die innere Leiste 2—4 mehr aufweist als die äußere. Mitunter werden 11—16 gezählt. Allein schon der Bau der Atemplatte gestattet eine bequeme Unterscheidung dieser Entwicklungsform von den beiden anderen Stadien. Auf die Tatsache, daß im 2. Stadium weniger Arkaden vorhanden sind, hat schon Meinert hingewiesen. Die Beachtung dieses Unterschiedes ist wesentlicher als die der Größe der Larve, welch letztere zu Fehlschlüssen führen kann.

Auch der Bau der Mundhaken ist charakteristisch und erhält sich dauernd unverändert. Der Haken dieses Stadiums ist um ein Vielfaches größer als im 1. Stadium, hingegen schwächer, schlanker und mehr gekrümmt als im letzten. Unterscheidet man an den einzelnen Mundhaken Krallen, Griff und Basis, so beträgt im 2. Stadium die Spannweite der Krallen am äußeren Bogen

gemessen 400 μ . Die Länge des Griffes ist 145 μ , die der Basis 250 μ . Im 3. Stadium der Larve betragen diese Maße für die Spannweite der Krallen 360 μ , für den Griff 310 μ und für die Basis 500—520 μ . Demnach ist der Mundhaken im 3. Stadium ungefähr doppelt so groß wie im 2., wobei die Verschiedenheit in der Form, besonders der Krallen, unberücksichtigt bleibt. Oberflächlich ist die Krallen des 2. Stadiums der Larve mit annähernd kubischen Chitinplatten belegt. Sie lagern sich dachziegelartig übereinander, so daß nach rückwärts gerichtete Vorsprünge entstehen. Diese wirken bei der Befestigung der Larve nach Art von Widerhaken. Sie machen das ungemein starke Festhalten der Larve in der Schleimhaut zum Teil verständlich.

Weiterhin unterscheidet sich die Larve des 2. Stadiums von der des 1. durch die Zahl der Segmente. An Stelle von 13 Leibesgliedern weist sie, ebenso wie das letzte Stadium, nur noch 11 Segmente auf. Die Verminderung der Segmentzahl geht also beim Uebergang der Larve vom 1. Stadium in das 2. vor sich. Bezüglich des 3. Stadiums liegt in diesem Punkte ein Erklärungsversuch von Joly vor. Ihm zufolge verschmelzen die 3 ersten Abschnitte der Larve zum Kopfsegment. Wir selbst glauben annehmen zu müssen, daß Segment 1 und 2 zum Kopfsegment werden. Segment 12 und 13 hingegen verschmelzen und bilden nunmehr als Segment 11 das Hinterende der Larve. Analog dürfte sich das Endstadium der Larve verhalten. Diese Deutung des Verlaufes der Reduktion der Körpersegmente findet ihre Stütze darin, daß der Umbau des Hinterendes der Larve des 2. und 3. Stadiums wohl noch umfangreicher ist, als wir ihn am Kopfende beobachten, ja zu einer neuen Formgestaltung der Larve führt.

Die Bedornung der Larve des 2. Entwicklungsstadiums ist folgende: Rücken: Das Kopfende weist eine 4—5fache Dornenreihe auf. Das 2.—6. Segment einschließlich zeigt eine 3fache Dornenreihe, wobei in der Mittellinie 2—3 Dornengruppen fehlen. Im 7. Segment fehlt bereits $\frac{1}{3}$ der Reihe. Im 8. Segment sind nur noch 1—3 Dornen seitlich vorhanden. Auch diese können fehlen oder nur einseitig vorhanden sein. Segment 9—11 erscheinen nackt. Links und rechts ist eine Seitenlinie an der Larve ausgespart.

Bauchseite: Im 2.—8. Segment einschließlich finden sich 3 Reihen Dornen. Im 9. Segment trifft man entweder nur die beiden oberen Dornenreihen oder 3, allerdings schwach besetzte Reihen an. In der Mitte dieses Segmentes fehlt ein Dornenpaar. Das 10. und 11. Segment bleibt nackt. Sowohl an der Rücken- wie auch an der Bauchseite stehen die 3 Dornenreihen alternierend untereinander. Die obere von ihnen führt die größeren Dornen, die untere die kleinen. Die Stacheln weisen in den verschiedenen Segmenten keine einheitliche Größe auf. Auch verändert sich diese mit dem Wachstum der Larve, indem durch allmähliches Verschieben aus der Kutikula eine Größenzunahme erfolgt. Bei einer reifen Larve des 2. Stadiums waren die Größen der Dornen im 6. Segment in der oberen Reihe: Länge mit Basis: 312—354 μ , Basisbreite 208 μ , in der mittleren Reihe: 196—218 μ bei einer Basisbreite von 104—125 μ , in der unteren Reihe betrug ihre Länge nur 83—91 μ . Bei jugendlichen Larven des gleichen Stadiums hingegen war in demselben Segment die Länge der Stacheln in der oberen Reihe nur 270 μ , in der mittleren 138 μ und 68 μ in der unteren Dornenreihe. Die Größe der Dornen ist also wechselnd nach dem Alter der Larve, nach dem Segment und nach ihrem Sitz in den einzelnen Reihen.

III. 3. Larvenstadium bis zur Verpuppung.

Die anatomischen Verhältnisse des 3. Larvenstadiums, also der erwachsenen Larve, sind hinlänglich bekannt. Es erübrigt sich demnach, hier auf Einzel-

heiten einzugehen. Ihre kurze Kennzeichnung soll lediglich zu dem Zwecke erfolgen, um einen Vergleich mit den vorhergehenden Stadien zu ermöglichen und einige Ergänzungen der bisherigen Beschreibung zu geben.

Von oben gesehen besitzt das Vorderende der Larve jetzt Dreieckform während ihre hintere Hälfte eine parallele Begrenzung und quer abgestutztes Ende zeigt. Ihre Länge beträgt 1,2—2 cm, bei einer Breite von 0,6—0,8 cm. Ihre Farbe ist blutrot bis auf das gelbliche Kopfsegment. Die Größe wechselt mit dem Sitz des Parasiten. Im Rachen erscheinen die Larven kleiner in der Gestalt, flacher, die seitlichen Muskelansatzstellen jeden Segmentes treten als dreieckige Felder deutlich hervor. Im Magen hingegen weist die Larve eine prallere Form auf, ihr Querschnitt ist fast rund, die seitlichen Muskelfelder sind kaum noch wahrnehmbar. Sie setzt sich wie das 2. Stadium aus 11 Segmenten zusammen. Die Kopfhaken sind plumper als im 2. Stadium. Die Krallen zeigen sich fast gestreckt. Der Haken ist auf die doppelte Größe angewachsen. Auch im 3. Stadium ist die Krallenoberfläche mit Chitinplatten bekleidet, die nach rückwärts vorspringen, als Widerhaken wirkende Leisten, besonders deutlich an den Randlinien sichtbar werdend. Die Stigmenplatte am Hinterende der Larve zeigt die gleiche Umrißlinie wie im 2. Stadium, allerdings in 3facher Größe. Jederseits sind 3 Arkaden von 1,0—1,2 mm Länge mit je 25—36 Querleisten (im Mittel 28) auffallend. Diese Querspangen sind für die Bestimmung wenig verwendbar. Sie wechseln in den einzelnen Arkaden an Zahl und sind auch bei den verschiedenen Individuen, sowie auch auf den beiden Seiten des gleichen Individuums wechselnd. Die obere Falte der Bursa trägt eine einfache kräftige Dornenreihe, ihr Schließrand ist fein gezähnt. Die ventrale Falte hingegen weist sowohl am Schließrande eine Reihe feinsten, dünner, langer Chitinhärchen auf wie auch ebensolche in 6 darunter stehenden Reihen. Während im 1. und 2. Stadium die beiden Haupttracheenstämme sich im Vorderende der Larve in ein feines Röhreneästchen verlieren, münden diese im 3. Stadium in 2 kräftige Äeste aus. Diese tragen an ihren Enden fingerförmig gelappte, plattenförmige Endapparate der Atemröhren. Ihre Lage ist die Höhe des 2. Segmentes in der Seitenlinie. Die Larve des 3. Stadiums besitzt demnach vordere und hintere Atemöffnungen.

An der Bauchseite des Kopfendes der Larve finden sich um die beiden Sinnespapillen jederseits 3 Dornenfelder von je 20—28 Stacheln. Unter ihnen bilden 7 Reihen Stacheln die Halsbedornung. Seitlich gehen diese in 3 Reihen des Kopfendes über. Letztere sind etwas größer als die Stacheln des Dornenkragens an der Bauchseite. Im übrigen gestaltet sich die Rückenbedornung wie folgt: Im 2. Segment bis einschließlich 6. Segment doppelte Bedornung mit kleiner Lücke in der Rückenmittellinie. Im 7. Segment nimmt die Lücke der doppelten Dornenreihe zu. Im 8. Segment sind jederseits nur 1—3 Dornenpaare vorhanden. Am 9., 10. und 11. Rückensegment fehlen die Dornen gänzlich. Kleinste schwarze Pünktchen, wohl als Rudimente der Dornen deutbar, können vorhanden sein.

Bauchseite: Das 2. Segment ist mit nur einer Dornenreihe ausgestattet. Gelegentlich fehlt in ihrer Mitte ein Dorn. Das 3.—9. Segment weist eine doppelte Reihe von Stacheln auf. Das 10. Segment ist wieder einreihig. Meist finden sich nur 6 gleichmäßig verteilte Stacheln. Gelegentlich ist ihre Zahl größer oder im Gegenteil kleiner, so daß unter Umständen nur noch 2 Dornen vorhanden sind.

In den Reihen mit doppelter Bedornung steht am Vorderende der Segmente unter einer Reihe größerer Stacheln in deren Zwischenräumen eine solche mit kleineren. Ihre Farbe ist hellbraun, die Spitze rötlich-braun mit dunkler Binde. Ihre Größe wechselt. Im mittleren Teil der Larve, im 6. Segment,

erreichen sie die Höchstmaße. In der oberen Reihe beträgt hier die Länge eines Stachels mit Basalplatte 600—800 μ , die Basismitte mißt 430—500 μ . In der unteren Reihe ist das Verhältnis 600 zu 260 μ . Es finden sich hier aber auch kleine Dornen von den Ausmaßen 170:120 μ .

Die angegebene Bedornung ist die reguläre. Daneben trifft man gelegentlich abweichende Bedornungen. Die Unterschiede können beträchtlich sein. So wurden z. B. von den Autoren folgende Bedornungen in Ausnahmefällen festgestellt:

Am Rücken im 8. Segment 2 Dornen auf jeder Seite. Am Bauch 10. und 11. Segment noch bedornt. Interessanter waren folgende Abweichungen: Am Rücken 9., 10. und 11. Segment unbedornt, an Bauchseite 2. Segment in der Mitte unterbrochen, 10. und 11. Segment völlig nackt. Außerdem in anderen Fällen: An Rückenseite im 9. Segment je 2 Dornen an den Seiten, 10. und 11. Segment nackt, Bauchseite zeigte 2. Segment in der Mitte unterbrochen, 3. Segment mit einer Reihe großer Dornen. Weiterer Bau regulär, im 10. Segment noch 4 Dornen vorhanden. Den sonstigen anatomischen Einzelheiten zufolge gehörten diese abweichenden Typen sämtlich dem 3. Stadium der Larve von *Gastrophilus pecorum* an.

IV. Sitz der einzelnen Larvenstadien im Tierkörper.

Das natürliche Eindringen der Larve in den Tierkörper konnten wir, da es sich um Untersuchungen an Leichenmaterial handelte, nicht beobachten. Die Larve des 1. Entwicklungsstadiums wurde von uns in der Schleimhaut der Mundhöhle, nach dem Pharynx zu wandernd, angetroffen. Ob dies die einzige Art des Vordringens zur Rachenschleimhaut darstellt, entzieht sich unserer Beurteilung. Die Larve bewegt sich in Gängen der Schleimhaut vorwärts, die entsprechend der Kleinheit der Larve außerordentlich zart sind. Zur Wanderung wird nur die Mundhöhlenschleimhaut verwendet. Eine Zuwanderung auf dem Wege durch die Schleimhaut der Nasengänge findet nicht statt. Larven, die in die Backenschleimhaut oder die distale Seite der Mandibula eingedrungen sind, überqueren den Winkel der Mandibel und Maxille, um zum Pharynx zu gelangen. Die Gänge sind leicht geschlängelt und gleichen anfänglich feinsten injizierten Lymphgefäßen. Die Larve ist vollständig in der Schleimhaut versenkt und wegen ihres zunächst noch glashellen Aussehens ungemein schwer festzustellen. Erst wenn sie an Größe zunimmt und dabei sich rötet, wird sie leichter erkennbar, zumal dann auch der Kanal sich mehr weitet und auffallender wird. Wegen der Zartheit der Gänge kommt es nicht selten streckenweise zur Ablösung der Decke. In der entstehenden Kanalvertiefung lagern sich Fremdkörper ab, die zu einer Braunfärbung des verlassenen Bettes der Larve führen. Mit der Neubildung des Deckepithels kann der Gang wieder völlig verschwinden. Die beim Pferde häufig vorhandene schwarze Pigmentierung der Mundhöhle erschwert die Beobachtung, ebenso wie auch Beschädigungen der Schleimhaut, z. B. durch Zahnschmerzen oder hartes Futter. Normalerweise erreicht die Larve vor ihrer 1. Häutung die Schleimhaut des Pharynx. Damit ist ihre aktive Wanderung beendet. Nicht selten trifft man jedoch auch noch 1. Stadien, die unmittelbar vor der Häutung stehen, und sogar jugendliche 2. Stadien in der Mundhöhlenschleimhaut an. Da diese Gänge viel stärker gewunden, zum Teil in kreisförmigen Bögen sich überkreuzen, ja selbst von hinteren Abschnitten des Mundes nach vorderen gerichtet sind, ist der Schluß berechtigt, daß hier Wanderungen verirrter Larven vorliegen. Das Größenwachstum, insbesondere die früher geschilderte Anschwellung am Hinterende der Larve des 2. Stadiums, bedingt, daß die Decke

des Ganges unmittelbar hinter der Larve einreißt, und schließlich die letzten Körpersegmente aus dem Kanale hervorragen. Die Larve kann ihre Wanderung schließlich völlig einstellen. Die Decke verliert sich in diesen Fällen allmählich ganz. Man trifft sie nun an ungewöhnlichen Orten frei hängend, wie z. B. an der Seitenzungenfläche. An anderen Stellen der Mundhöhle wird sie wohl meist mechanisch bei der Futteraufnahme abgerissen und passiv rückwärts befördert. Das 2. Stadium ist eben, wie aus der früheren Beschreibung hervorgeht, für eine aktive Wanderung in der Haut nicht gebaut. Die Larve ist behindert durch die mächtigen, mit zahlreichen Widerhaken versehenen Mundhaken und durch die Umwandlung der hinteren Atmungsöffnungen, welche den direkten Zutritt der Luft als zum Leben erforderlich erscheinen lassen.

Der reguläre Sitz des 2. Stadiums der Larve ist die Rachengegend. Bevorzugt wird die Gegend vor den Tonsillen und die Mundseite des Palatum molle. Zunächst noch völlig in die Schleimhaut eingegraben, heben die Larven sich allmählich mit ihrem Hinterende heraus und hängen mit vorschreitendem Wachstum nur noch mit dem Kopfbende fest. Ist das Ende des Wachstums des 2. Larvenstadiums erreicht, so bereitet sie sich zu einer neuen Häutung vor. Die Larvenhaut des 2. Entwicklungsstadiums umschließt dann die junge Larve der 3. und letzten Larvenform. Schließlich zerreißt die Larvenhaut, am Rücken am Kopf beginnend, über 4—6 Segmente hin, und das 3. Stadium schlüpft hervor. Die alte Larvenhaut bleibt an der ursprünglichen Anheftungsstelle hängen. Sie löst sich nicht ab, wird aber unter gewöhnlichen Verhältnissen alsbald beim Schlucken der Futterbissen zerstört. Bei Pferden, die nach Schlucklähmungen zugrunde gegangen sind, können sie völlig intakt bei der Zerlegung der Tiere aufgefunden werden. Der ungestörte Schluckakt ist nach unserer Anschauung auch maßgebend für das weitere Schicksal der Larve. Schluckt das Pferd beim Hervortreten der Larve des 3. Stadiums nicht — offenbar veranlaßt der Juckreiz der sich bewegenden Larve das gesunde Tier zu diesem Akt, wenn der Austritt nicht während des Fressens sich vollzieht —, so heftet sich die Larve erneut am Gaumen fest. Man hat dann Gelegenheit, auch das 3. Stadium im Rachen vorzufinden. In besonders großer Zahl haben wir sie bei myogener Schlucklähmung im Anschluß an Hämoglobinurie und bei zentraler, infolge Tetanus, neben leeren Larvenhäuten des 2. Larvenstadiums dort vorgefunden. Der Aufenthalt im Rachenraum scheint indes nicht die besten Lebensbedingungen für die Larven des 3. Stadiums abzugeben. Sie bleiben dort gewöhnlich wesentlich kleiner als die gleichaltrigen Formen des Magens. Von Herrn Prof. Schroeder wurden uns 25 Exemplare von *G. pecorum*, die während des Lebens aus dem Rachen verschiedener Pferde entnommen waren, freundlichst überlassen. Sie gehörten sämtlich dem 3. Entwicklungsstadium an. Ihre Größe schwankte zwischen 1,2 und 1,5 cm.

Wenn das erwachsene Stadium der Larve sich bereits wieder in der Rachenschleimhaut festgeheftet hat, dürften die Schluckbemühungen des Pferdes wohl vergeblich sein. Das Pferd übt dabei Bewegungen aus, die dem Koppakt nicht unähnlich sind. Es wäre der Mühe wert, Untersuchungen darüber anzustellen, ob das Koppen des Pferdes nicht in manchen Fällen mit dem Befall des Rachens mit den *Gastrophilus*-Larven, besonders des 3. Stadiums, in Zusammenhang steht. Naturgemäß kommen hierbei nur *G. pecorum* und *G. haemorrhoidalis* in Betracht, nicht *G. nasalis* und *G. equi*, weil diese, entgegen den Angaben der Literatur, nach unseren Feststellungen sich nicht im Rachen festzusetzen pflegen. Zwei Beobachtungen dieser Art von Prof. Schroeder, Dorpat, können hier mitgeteilt werden. 2 Pferde waren nach einem Anfall von Hämoglobinurie mit Schlucklähmung gesundet. Mit

fortschreitender Genesung entwickelte sich bei ihnen die Untugend des Koppens. Der Autor führte die Entstehung des Koppens in diesen Fällen auf die Regeneration der Muskulatur zurück. Wir haben oben darauf hingewiesen, daß es in solchen Fällen zu einer Massenbesiedelung des Rachens mit *G. pecorum* des 3. Stadiums kommen kann. Bei der Häufigkeit dieser Larven in der Umgebung von Dorpat muß jener Vorgang als Regel bezeichnet werden. Der Juckreiz der beborsteten Fremdkörper im Rachen, kontinuierlich wirkend, würde zu fortgesetzten Schluckbewegungen und gleichzeitig zum Abschlucken von Speichel und Luft Veranlassung geben. Es wäre denkbar, daß dieses Verhalten des Tieres auch nach dem Abgang der Larven bestehen bleibt. Wie aus der Arbeit von Prof. Saral hervorgeht, ist die Untugend des Koppens beim Pferde in der Umgebung von Dorpat tatsächlich stark verbreitet. Diese Hinweise sollen lediglich zu Beobachtungen in der gegebenen Richtung anregen, da ja die bisher vorgebrachten Theorien der Entstehung dieser Untugend des Pferdes in keiner Weise befriedigen können.

Ausnahmsweise können Larven des 2. Stadiums auch auf der Magenschleimhaut angeheftet vorgefunden werden. Der Nachweis früherer Stadien ist uns dort nicht gelungen. Im übrigen bildet die Linea serrata, die Drüsenschleimhaut, seltener die kutane Schleimhaut des Magens, den natürlichen Aufenthaltsort der reifenden Larve. Das Duodenum wird von ihr nicht besiedelt. Vor dem endgültigen Abgang aus dem Tierkörper heftet sich *G. pecorum* noch im Endteile des Rektums, der sogenannten Rosette, fest. Die Farbe dieser Larven ist die gleiche wie im Magen. Sie wird also nicht grün, wie *Gast. haemorrhoidalis*. Schon an diesem Farbunterschied ist sie unschwer von jener zu unterscheiden. Daß die Larven im Rachen, wie auch im Magen, postmortal ihren Sitz nicht selten wechseln, herumwandern und sich erneut festsetzen, ist zu berücksichtigen. Das Fehlen jeglicher Gewebsreaktion an der Anheftungsstelle gibt die nötigen Fingerzeige, sich vor Fehlurteilen zu bewahren.

V. Pathologisch-anatomische Veränderungen, hervorgerufen durch Wanderung und Anheftung der Larven.

Die Larve des 1. Stadiums erzeugt, wie bereits erwähnt, Bohrgänge in der kutanen Schleimhaut der Mundhöhle. Sie sind vollständig im Deckepithel der Seitenzungenfläche und Backenschleimhaut liegend, wie auch in der Schleimhaut der Mandibula und weisen eine intakte Ueberdachung auf. Ihr Verlauf ist parallel zur Oberfläche. Sie bewegen sich im Stratum spinosum und greifen auch auf das Stratum granulosum und lucidum über. Der Papillarkörper selbst bleibt im allgemeinen unberührt. Die Gänge verlaufen demnach im eben verhornenden Epithel. Durch Zusammenpressen der noch weichen Epithelien beim Vordringen der Larve entsteht ein Kanal. Die Epithelien umsäumen ihn als längliche flache Schuppen, ohne ihre alte Gestalt wieder zu gewinnen. Der dadurch entstehende zylindrische Hohlraum fällt nicht zusammen. Er füllt sich auch nicht mit Exsudat und Transudat. Aus der topographischen Lage der Gänge wird das Fehlen stärkerer reaktiver Prozesse, insbesondere von Blutungen, verständlich. Eine Reaktion tritt überhaupt nur dann auf, wenn das Stratum cylindricum bzw. der Papillarkörper selbst von der Larve beschädigt wird. In diesem Fall erfolgt eine Zuwanderung von Abwehrzellen aus der Tiefe des Papillarkörpers als Ausdruck des Ausgleiches des Fremdkörperreizes. Auch dieses hält sich in mäßigen Grenzen. Eine ausgeprägte Eosinophilie tritt nicht in Erscheinung.

Derart bleiben die pathologisch-anatomischen Verhältnisse auch in den jüngsten Stadien nach der 1. Häutung. Die Größenzunahme der Larve ver-

anlaßt sie keineswegs, tiefer zu graben, sondern ihr Aufenthalt bleibt das eben verhornende Epithel. Die Decke des Ganges hält aber dem Druck des schwellenden Hinterendes der Larve nicht mehr stand. Sie weicht auseinander, und das Hinterteil der Larve ragt nunmehr frei aus einer Schleimhautmulde hervor. Der zurückgelegte Weg wird noch durch eine längere Zeit bestehen bleibende Epithelexkoration erkennbar.

Mit der Größenzunahme des 2. Stadiums, das nunmehr im Rachen angekommen ist, weicht die Decke schließlich so weit zurück, daß die Larve nur noch mit dem Kopfende befestigt erscheint. Die Anheftungsart gleicht hier völlig der des 3. Stadiums. Die Art der Veränderungen, die durch diese Anheftung auf der Schleimhaut erzeugt werden, ist hinlänglich bekannt. Kennzeichen der intravitale Anheftung ist die Reaktion des Gewebes, eine schwache demarkierende Entzündung, die eine leichte wallartige Erhebung um das eingegrabene Vorderende der Larve auslöst. Fehlt diese, so handelt es sich um Larven, die nach dem Tode des Tieres ihre Anheftungsstelle gewechselt und sich erneut festgesetzt haben. Diese Larven dringen so weit in die Schleimhaut vor, bis die Region der Lymph- und Blutgefäße ihnen zugänglich wird. Die Submukosa erreichen sie nicht. Das Gleiche gilt für das 3. Stadium. Die Annahme, daß *Gastrus*-Larven gelegentlich beim Pferde Magenkrebs auslösen, entbehrt jeder Begründung und ist unwahrscheinlich.

Zweimal haben wir eine Perforation des Schlundes beobachtet. In dem einen Fall lag sie 10 cm vom Pharynx entfernt, im anderen Falle 30 cm von der Kardia. Beidemal war eine Grube durch sämtliche Wandschichten des Oesophagus hindurchgehend vorhanden. Der Kopf der Larve lag im periösophagalen Bindegewebe angeheftet, umgeben von derberem Granulationsgewebe. Der Körper selbst lag in dem Kanal, umgeben von braungrauem Eiter. Die Schleimhaut wies einen scharf begrenzten, ovalen Defekt auf und war am Rande leicht aufgeworfen. Mukosa und Muskularis erschienen lokal straff miteinander verwachsen. Beide Male handelte es sich um eine Larve des 3. Entwicklungsstadiums von *G. pecorum*. Da pathologisch-anatomische Befunde von Bedeutung fehlten, können diese Perforationen des Schlundes nur als Nebenfunde gewertet werden. Eine Perforation des Magens von seiten dieser Larven ist uns nicht zur Beobachtung gekommen. Ebensowenig kamen uns Fälle postmortaler Durchbrechung der Schleimhaut und Muskularis durch die Larve zu Gesicht, wie der eine von uns gelegentlich bei anderen *Gastrophilus*-Arten beobachten konnte.

Schluß.

Es wäre hier der Ort, schließlich noch über Fundzeit, Zahl und Fundort der Larven von *Gastrophilus pecorum* nähere Angaben zu machen. Der Raumersparnis wegen verschieben wir diese Mitteilung auf später, um dann gleichzeitig über *G. nasalis*, *haemorrhoidalis* und *equi* zu berichten, deren Anatomie und Biologie näher zu studieren, schon aus dem Grunde notwendig war, um bezüglich *G. pecorum* zu gesicherten Ergebnissen zu gelangen. Wir sind uns bewußt, besonders in der Angabe bezüglich des regulären Sitzes der Frühstadien und gelegentlich auch des Endstadiums von *G. pecorum* im Rachen des Pferdes mit den Angaben der Literatur in Widerspruch zu stehen. Sowohl regulär wie irregulär soll unsere *Gastrophilus*-Larve dort nicht gefunden werden. Durch die bisherige Unkenntnis in der Unterscheidung der einzelnen Frühstadien der 4 *Gastrophilus*-Arten erscheint uns diese unzutreffende Auffassung in der Literatur begreiflich.

Erklärung zu den Photogrammen.

Fig. 1. Erstes Larvenstadium, aus Bohrgang der Seitenzungenschleimhaut des Pferdes.

Fig. 2. Erstes Häutungsstadium, aus Bohrgang des Gaumens vom Pferd. Am Vorderende Hakenapparat des 1. Stadiums sichtbar, an Hinterende links künstlich mit Luft gefüllte, doppelte Atemspange des 2. Stadiums auffallend.

Fig. 3. Vergrößertes Hinterende von Fig. 2. Deutlich sichtbar die Doppelarkaden des 2. Larvenstadiums (links schwarz, weil mit Luft gefüllt, rechts schwach hervortretend), zwischen ihnen die 2 Atemröhrenden des 1. Larvenstadiums hervortretend am Hinterende.

Fig. 4. 2. Larvenstadium, jugendlich. Besonders Umwandlung des Kopfhakenapparates und Larvenendes auffallend. 11 Segmente.

Fig. 5. Mehrere Bohrgänge auf hartem Gaumen des Pferdes von Gastr. pec., Stadium 1 (Häutungsstadium) oder jüngstes 2. Stadium.

Fig. 6. Histologischer Schnitt des Bohrganges. Papillarkörper bleibt im allgemeinen verschont.

Fig. 7. Vorderende eines 2. Larvenstadium beim Uebergang in das 3. Stadium: Doppelte Hakenanlage. Vordere Atemöffnung des 3. Stadiums (besonders linkerseits) erkennbar.

Fig. 8. Schleimhautstück des weichen Gaumens vom Pferd: Larve des 3. Stadiums (dunkel), daneben (hell) ihre Larvenhaut des 2. Stadiums.

Nachdruck verboten.

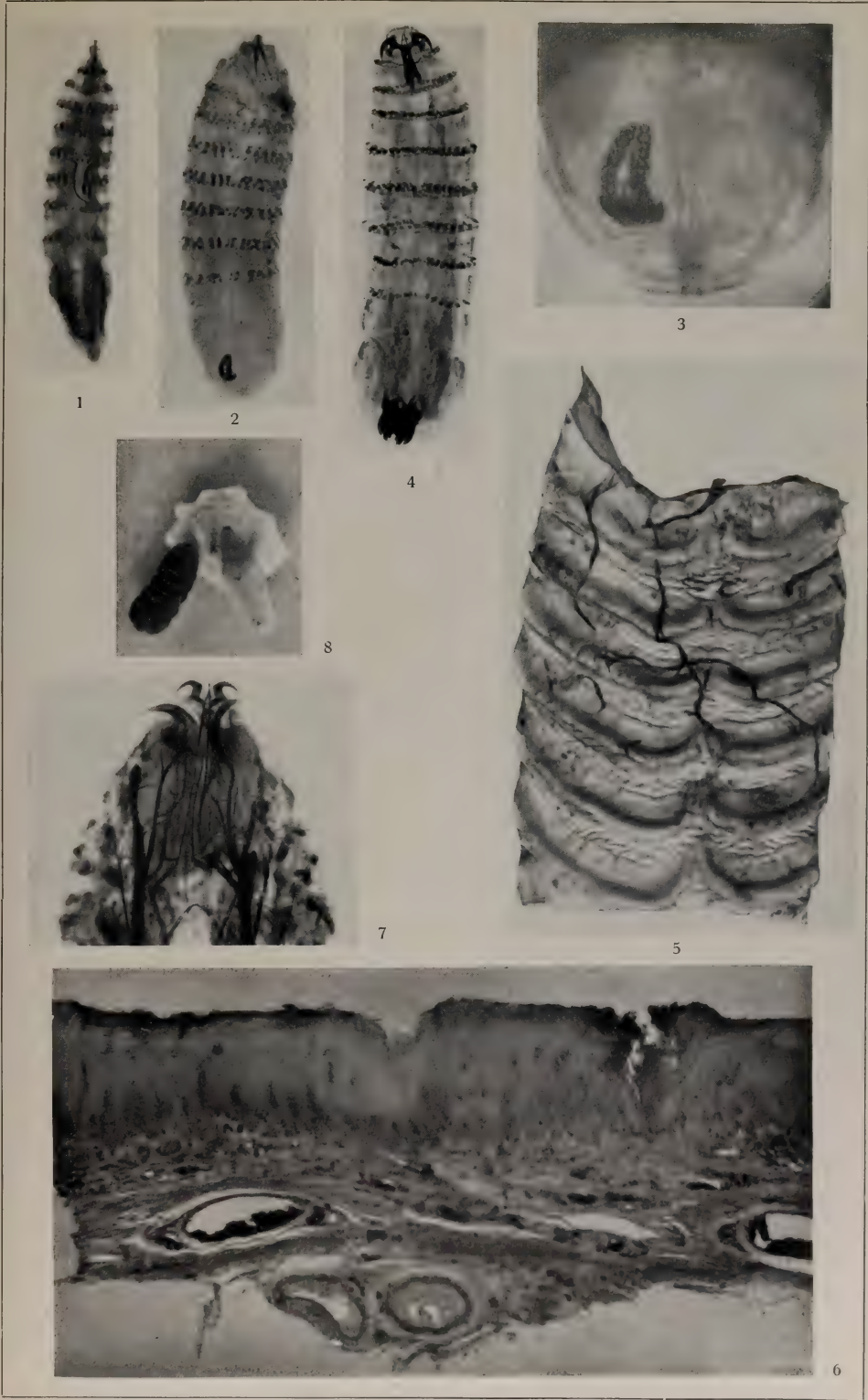
Zur Hakenwurmverbreitung in Turkmenistan.

[Aus dem Staatsinstitut für Sanitarie und Hygiene, Moskau (Direktor: Prof. P. N. Diatroptov), Epidemiologische Abteilung (Abteilungsleiter: S. B. Dubrowinski).]

Von S. B. Dubrowinski, A. M. Kranzfeld, W. D. Rosenfeld,
E. G. Salamandra.

Mit 1 Abbildung im Text.

Vorliegender Bericht umfaßt einen Teil unserer helminthologischen Untersuchungen bei verschiedenen Gruppen der Bevölkerung in Moskau und ihrer Umgegend. Im Laufe dieser Arbeit, die sich auf 3060 Personen bezieht, untersuchten wir im Herbst 1926 171 Turkmenen in 3 Gemeinschaften und konstatierten in 33 Fällen Hakenwurmeier. Dieser Befund darf Interesse beanspruchen, da die Erfahrungen über die Hakenwurmverbreitung in der U. d. S. S. R. nur spärlich und unvollständig sind, diesbezügliche Angaben für die turkmenische Republik überhaupt nicht vorliegen. Die von der Rockefeller-Kommission zusammengestellte Karte (1) des Verbreitungsgebietes der Ankylostomiasis in der Welt gibt keinen Hinweis auf ihr Vorkommen in unserem Lande. Dagegen zeigt die bei Ruge (2) und bei Hübener (3) angeführte Karte einen breiten Landstrich am Schwarzen und Kaspischen Meer, wo Ankylostomiasis vorhanden sein soll. Malvoz (4) weist auf die Verseuchung der Schwefelgruben Südrußlands hin. Die Quellen, auf Grund deren die genannten Autoren ihre Angaben bringen, sind uns nicht bekannt. In der russischen Literatur finden wir bis 1925 nur Mitteilungen über vereinzelte Fälle, von welchen die meisten der Anamnese nach keine einheimischen, sondern eingeschleppte waren (5, 6, 7). 1925—26 beschreibt Kalantarian (8) in Armenien 11 Fälle von Hakenwurm-invasion bei Kindern von Flüchtlingen aus Palästina. Die Gegenden, wo in der U. d. S. S. R. endemische Herde zu vermuten wären — Transkaukasien und Mittelasien — sowie auch unsere Bergwerke, wurden bis zur letzten Zeit nicht speziell erforscht. Erst vor kurzem ist das Vorkommen der Hakenwurmkrankheit in Georgien (Parzwanidse (9), Machwiladze und Didebulidse (10)), Abchasien und Adscharistan (Lindtrop (7, 11), Ruchadse (12), Blaschin (13)), auch in Aserbeidschan (Lindtrop (7, 11, 14)), Ter-Grigorowa (15)) bekanntgegeben worden. In den ersten drei Republiken sind Ankylostoma und Nekator, in der letzten nur Ankylostoma gefunden worden. Außerdem fanden Mudschiri (16) u. Ter-Dschanian (17) Ankylostomiasisfälle in verschiedenen Orten an der Transkaukasischen Eisenbahnlinie. Die genannten Autoren untersuchten insgesamt ungefähr 2000 Personen in speziellen Expeditionen und im Laufe ihrer laboratorischen und klinischen Arbeit. Das veröffentlichte Material gibt keine Möglichkeit, die Lokalisation der Ankylostomiasis in Transkaukasien exakt aufzustellen, bietet aber genügend Anhaltspunkte, um ihre weite Verbreitung dort anzunehmen. Es werden auch schwere Fälle mit hoher Invasion notiert (über 1500 Para-





siten in einem Fall von Blaschin). In Mittelasien waren bis jetzt nur die von Semonov (18) angeführten 3 Fälle einheimischer Invasion bekannt. Was unsere Kohlengruben anbetrifft, so sind wir vorläufig nur über das Donezkohlengebiet unterrichtet, wo die Expedition von Skrjabin 1925 Massenuntersuchungen ausführte und bei 7500 Untersuchten keinen einzigen Fall von Ankylostomiasis verzeichnen konnte (19). Es muß hier erwähnt werden, daß in demselben Bezirk (Nowotscherkassk) Rajewskaja (20) unter 100 Proben von Fäkalien, die aus 4 halberfallenen, als Abtrittstellen benutzten Häusern entnommen wurden, in einem Falle *Necator*-Eier fand. Die Differentialdiagnose des Eies wird indes nicht angeführt.

Gehen wir nun zu unseren Ermittlungen über. Wir begannen unsere Untersuchungen in einem Schulinternat für Turkmenen, in der Umgegend von Moskau gelegen, und stellten dort unter 106 zurzeit anwesenden Schülern im Alter von 10—17 Jahren bei 31 *Ankylostomum*-Invasion fest. Wir bedienten uns hierbei der Methode Kofoid-Barber-Fülleborn und der folgenden Durchmusterung von Ausstrichen, die vom Bodensatz nach Abgießen der Flüssigkeit entnommen wurden. Dieses letztere Verfahren übten wir in allen unseren Untersuchungen als Ersatz für die gewöhnlichen Kotausstriche. Auf diese Weise konnten wir Ascarideneier, hauptsächlich unbefruchtete, in einem bedeutenden Prozentsatz (in der Gesamtarbeit bis 21 Proz.) noch dann nachweisen, wenn die Fülleborn-Methode negativ ausfiel. Für *Ankylostomum*-Eier erhielten wir dabei keine ergänzenden Resultate. 24 Proben wurden noch nach Telemann bearbeitet. Auch mit dieser Methode erzielten wir keine neuen Ergebnisse. Alle Schüler, bei welchen die erste Probe keine *Ankylostomum*-Eier aufwies, wurden wiederholt nach Fülleborn untersucht; es konnten noch 2 weitere Hakenwurmfälle ermittelt werden. Bei 95 Kindern unternahmen wir 2mal die rektale Schabeprobe auf *Enterobius vermicularis*.

Die *Ankylostomum*eier wurden in jedem Falle gemessen, wobei folgende Zahlen festgestellt wurden: Maximum Länge 67, Breite 43, Minimum Länge 55, Breite 37 μ . Der Versuch, Larven aus den Fäzes zu züchten (nach dem von Fülleborn angegebenen Verfahren), ist uns nicht gelungen. Der Grund des Mißerfolges wird wohl darin zu suchen sein, daß die Zustellung der Proben ins Laboratorium, die einige Stunden in Anspruch nahm, an einem frostigen Tage geschah, wobei die Eier ihr Vermögen zur Weiterentwicklung einbüßen konnten. Zur endgültigen Feststellung der Diagnose unternahmen wir bei 2 Knaben eine Thymokur und erhielten bei beiden weibliche und männliche Tiere der Art *Ankylostoma duodenale*. Die Zahl der abgetriebenen Würmer war gering. Ob wir es bei allen Invasierten nur mit *Ankylostoma duodenale* zu tun hatten, oder ob auch Infektion mit *Necator americanus* vorhanden war, muß dahingestellt bleiben, da wir die Abtreibungskur bei allen Behafteten nicht vornehmen konnten. Für die Epidemiologie und Klinik hat diese Frage wohl keine Bedeutung.

Auf der beiliegenden Karte Turkmenistans sind die Ortschaften angegeben, aus welchen die Untersuchten herkommen. Das uns interessierende Gebiet liegt zwischen 37° und 40° nördlicher Breite (21), also etwas oberhalb der Grenze, die für die endemische Verbreitung der Wurmkrankheit über Tage allgemein angenommen wird. Der äußerste westliche Punkt, aus dem die Kinder stammen, ist die Insel Tscheleken im Kaspischen Meer; der östlichste die Stadt Karki am Fluß Amu-Darja. Unter den Herkömmlingen aus dem nordwestlichen Teile des erwähnten Gebietes, von Tscheleken bis Kisyl-Arvat, sind keine *Ankylostomum*behafteten festgestellt worden. Der Parasit ist nur bei den Kindern gefunden, die aus dem südlichen Teile kamen. Diese Gegend hat ein streng kontinentales Klima. Der Sommer zeichnet sich hier durch die lange Dauer und große Hitze aus, seine Durchschnittstemperatur übertrifft 30°. Höhere Sommerwärme wird nur in einigen Orten Afrikas, Arabiens,

Südpersiens und in Mittelastralien beobachtet. Der Winter ist im Süden Turkmenistans kurz; die mittlere Temperatur des Januars beträgt $-0,2^{\circ}$ bis $-1,3^{\circ}$, obgleich auch zuweilen erhebliche, aber nur kurzdauernde Fröste (-20 bis 27°) bekannt sind. Die durchschnittliche Jahrestemperatur beträgt 16° . Mangel an atmosphärischen Niederschlägen im Laufe des größten Teiles des Jahres veranlaßt die Bevölkerung, welche sich mit Landarbeit auf Reis- und Baumwollfeldern beschäftigt, außerdem viel Gemüse- und Gartenbau treibt, künstliche Bewässerungsanlagen (Aryken) zu benutzen. Das kulturelle Niveau der Eingeborenen ist noch sehr niedrig, die Lebensgewohnheiten sind primitiv. Ziehen wir diese Umstände einerseits, die beschriebenen klimatischen Verhältnisse andererseits in Betracht, so müssen wir zugeben, daß hier günstige Bedingungen zur Verbreitung der Wurmkrankheit vorhanden sind.

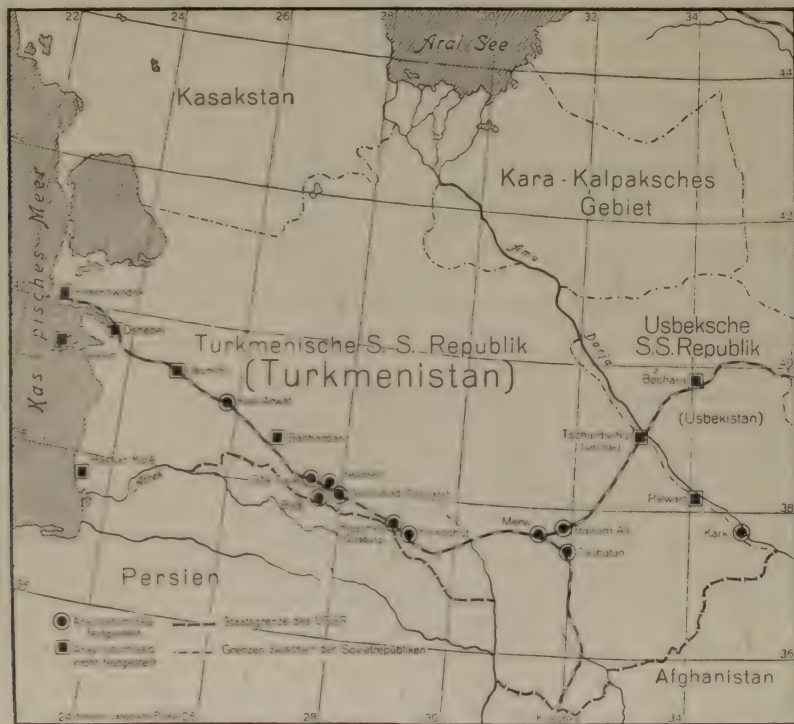


Fig. 1.

Die Untersuchten sind fast alle Kinder von Dekchanen (Landleuten), nur 4 gehören Beamtenfamilien an. Ihre Aufenthaltsdauer in der Schule ist eine verschiedene; ein Teil kehrt für die Ferien in die Heimat zurück. Bei 6 von den 31 Ankylostomuminvasierten wurde die Untersuchung in wenigen Tagen nach ihrer Ankunft unternommen; bei 7 in einem halben Jahr nach der letzten Rückkehr aus Turkmenistan. Die übrigen befinden sich hier ununterbrochen schon seit 1–3 Jahren. Die in Rede stehende Schule ist von der Turkmenischen Republik in der Hauptstadt der R.d.S.S.R. eingerichtet worden, um hier die Vorbereitung nationaler gebildeter Kräfte möglich zu machen. Die Lebensbedingungen im Internat sind verhältnismäßig günstig. Das Haus liegt auf einem Hügel am Ufer der Moskwa und ist rings von Wald umgeben; die Kinder verbringen ihre Freistunden selbst im Winter draußen. Die Ernährung ist dem Kaloriengehalte nach genügend, auch wird die Kost nicht schlecht zubereitet. Das Gebäude, wenn auch den Anforderungen eines

gut eingerichteten Kinderheimes nicht ganz entsprechend, hat Kanalisation und Aborte mit Wasserspülung. Das Moskauer Klima vertragen die Turkmenen gut. Nach den Aussagen des Arztes leiden die herkommenden Kinder oft an Malaria, Trachom und verschiedenen Hautkrankheiten (Favus, Orientbeule u. a.). Die in der Schule durchgeführte Behandlung gibt gute Resultate. Wir unterzogen die mit Ankylostoma Behafteten keiner eingehenden klinischen Untersuchung. Dem äußeren Aussehen nach sind es gesunde Kinder. Die Blutuntersuchung wurde bei 23 von ihnen angestellt. Das Leukozytenbild ergab fast bei allen Eosinophilie (unter 5 Proz. nur bei 2 Kindern, je einmal 5—6 Proz., bei den übrigen 7—26 Proz.), und bei den meisten Lymphozytose (bis 46 Proz.); mäßige Kernverschiebung bestand nur in einzelnen Fällen. Der Hämoglobingehalt erwies sich als wenig von der Norm abweichend (Minimum 55 Proz., in einem Falle, Maximum, 95 Proz., durchschnittlich 75 Proz.). Das Fehlen einer ausgesprochenen Blutarmut und die beim größten Teil der Befallenen verhältnismäßig nur geringe Zahl der Hakenwurmeier in den Fäzes lassen uns vermuten, daß wir es hier mit leichter Infektion, vielleicht nur mit Wurmträgern zu tun haben. Dieser Umstand kann möglicherweise mit dem längeren Aufenthalt in einer Gegend, wo Reinfektionen nicht denkbar sind, und teilweiser Selbstheilung in Verbindung gestellt werden.

Bei so hohem Prozentsatz der Ankylostomiasis bei diesen Knaben schien es uns geboten, weitere Forschungen in Turkmenengruppen, die wir in Moskau finden konnten, vorzunehmen. Wir untersuchten noch 25 Studenten einer Arbeiterfakultät und eine Gemeinschaft von Arbeitern und ihren Familien (40 Personen) aus der Textilfabrik in Reutowo bei Moskau. Wir arbeiteten hier nur nach Fülleborn mit nachfolgender Durchmusterung von Präparaten aus dem Bodensatz. In diesen beiden Gruppen konstatierten wir bei einmaliger Untersuchung je einen Fall von Ankylostomiasis. Da die Zustellung des Materials Schwierigkeiten ergab, war es nicht möglich, die negativ Befundenen wiederholt zu untersuchen. Die zwei Invasierten stammen aus Besmein und Bagir. Sie verließen Turkmenien vor ungefähr einem Jahr.

Tabelle I.
A. Nach Fülleborn.

Alter	bis 10 Jahren	10—18	Erwachsene	Gesamtzahl
a) allgemeine Resultate				
untersucht	12	106	53	171
invasiert befunden	2	63	8	73
b) konstatierte Wurmart.				
Ankylostoma	—	31	2	33
Trichuris	—	16	4	20
Ascaris	2	11	3	16
Enterobius	—	11	1	12
Hymenolepis nana	—	6	—	6
Taenia	—	3	—	3
Gesamtzahl der Invasionen	2	78	10	90
c) Grad der Invasion.				
Invasion mit 1 Art	2	51	6	59
mit 2 Arten	—	9	2	11
mit 3 Arten	—	3	—	3
Gesamtzahl	2	63	8	73
B. Rektale Schabeprobe (auf Enterobius vermicularis).				
untersucht		95		
invasiert mit Enterobius		45		

Die allgemeinen Resultate der helminthologischen Untersuchung bei allen Turkmenen finden sich in Tabelle I zusammengestellt; die Ergebnisse der Schabeprobe sind hier besonders angeführt.

Die Tabelle II zeigt den Prozentsatz der positiv Befundenen unter den Turkmenenkindern im Vergleich zu dem Grad der Invasion, die wir für dasselbe Alter bei Moskauer Kindern feststellten. Bei letzteren wird ein viel höherer Befall mit *Ascaris*, *Trichuris* und *Enterobius* beobachtet; bei den Moskauer Kindern wurde ferner *Trichostrongylus*-Invasion festgestellt, die bei den Turkmenen fehlte.

Tabelle II.

Alter 10—18			
		Turkmenen	Moskauer Kinder
nach Fülleborn	untersucht	106	682
	behaftet gefunden mit		
	<i>Ankylostoma</i>	29 %	—
	<i>Ascaris</i>	10 %	45 %
	<i>Trichuris</i>	15 %	32 %
	<i>Trichostrongylus</i>	—	4 %
Rektale Schabeprobe	<i>Hymenolepis nana</i>	6 %	3 %
	untersucht	95	322
	nach einmaliger Probe mit <i>Enterobius</i> behaftet gefunden	30 %	82 %
	nach zweimaliger Probe	47 %	zweite Probe nicht vorgenommen

Es wird von Interesse sein, hier noch über die Untersuchung einer Gruppe von 69 Usbeken — aus einer Gemeinschaft von 200 Studenten — mitzuteilen, da Usbekistan in der Nachbarschaft von Turkmenistan liegt. Bei einmaliger Untersuchung nach Fülleborn konnten wir keine Hakenwurmeier konstatieren; Proben zur Kontrolle wurden nicht zugestellt. Befall mit anderen Würmern war nur in 4 Fällen vorhanden, dabei 3mal Invasion mit je einer Art (*Trichuris*, *Ascaris*, *Hymenolepis nana*) und einmal mit 3 Arten (*Trichuris*, *Enterobius*, *Hymenolepis nana*). Es gelang uns nicht, Material von den übrigen Usbeken zu erhalten.

Ferner sei noch darauf hingewiesen, daß wir auch unter 43 untersuchten Chinesen bei 2 aus Nordchina stammenden Studenten Hakenwurminvasion fanden.

Mit der Feststellung der Ankylostomiasis bei den in Moskau weilenden Turkmenen und Chinesen werden folgende Fragen wachgerufen: 1) ob in einem Teil der Fälle die Uebertragung in der Schule unter den Bedingungen des Zusammenlebens stattfinden konnte, und ob eine Verbreitung der Wurmkrankheit in unserer Gegend möglich ist; 2) ob die Orte, aus welchen die positiv Befundenen herkommen, als endemische Herde angesehen werden müssen. Es ist schwer anzunehmen, daß eingeschleppte Ankylostomiasis zur Verbreitung des Parasiten unter unseren klimatischen Bedingungen und Lebensgewohnheiten führen könnte. Eine Uebertragung der Krankheit über Tage im gemäßigten Klima ist nach den Literaturangaben nicht bekannt. Wir machten uns zur Aufgabe, die nichtturkmenischen Bewohner des Internats — das Personal und seine Familien — zu untersuchen. Wir erhielten Proben von 20 Personen; alle waren frei von Ankylostomumeiern. Diese negativen Ergebnisse für eine Gruppe, die in ständigem Verkehr mit den Turkmenen

steht und in ähnlichen Verhältnissen lebt, bekräftigen uns in der Annahme, daß eine Infektion im Internat wohl ausgeschlossen werden kann. Folglich müssen die Herkunftsorte unserer Ankylostomiatiker als endemisch erklärt werden. Wie schon oben beschrieben, finden die Parasiten hier alle nötigen Bedingungen zu ihrer Entwicklung. Unsere schematische Karte soll das Verbreitungsgebiet der Ankylostomiasis in Turkmenistan nach unseren Ermittlungen zeigen¹⁾. Sie darf keineswegs als erschöpfend angesehen werden; die Zahl der endemischen Herde wird sich gewiß nicht auf die von uns verzeichneten beschränken. Nur weitgehende Untersuchungen der einheimischen Bevölkerung in ihrem Lande werden vollen Aufschluß darüber geben können.

Literatur.

- 1) Vaughan, *Epidemiology and Public Health*. Vol. 2. 1923. — 2) Ruge, Mühlens und zur Verth, *Krankheiten und Hygiene der warmen Länder*. 1925. — 3) Hübener, *Allgemeine Epidemiologie und Immunität*. (Weyls Handb. d. Hyg. Bd. 8. 1918. 1. Abt.) — 4) Malvoz, *Hygiène du travail*. 1925. No. 25. — 5) Karschin, *Russki Wratsch*. 1905. No. 6. [Russ.]; Ref.: *Centralbl. f. Bakt. Abt. I*. Bd. 37. 1904. S. 504. — 6) Popov, A. M., Bericht üb. d. I. ost-sibirische Aertztagung 20.—25. Aug. 1924. Irkutsk 1925. [Russ.]. — 7) Lindtrop, *Russki Journ. Tropitscheskoi Mediziny*. 1926. No. 4—5. [Russ. mit franz. Zusammenfassung.] — 8) Kalandarian, *Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg.* Bd. 30. 1926. H. 2. — 9) Parzwanidse, *Necator americanus hominis in Georgia*. (Inst. f. Tropenmed. i. Georgien. Tiflis 1925.) [Georgisch, mit deutscher Zusammenfassung.] — 10) Makhviladse et Dideboulidse, *Bull. Soc. Path. exot.* Vol. 19. 1926. Déc. — 11) Lindtrop, *Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg.* Bd. 29. 1925. H. 11. — 12) Ruchadse, *Kongreßbericht*. (*Centralbl. f. Bakt. Abt. I*. Ref. Bd. 86. 1927. Nr. 7/8. — 13) Blaschin, *Russki Journ. Tropitscheskoi Mediziny*. 1926. No. 5; 1927. No. 1. [Russ. mit franz. Zusammenfassung.] — 14) Lindtrop, *Wratschebnaja Gazeta*. 1925. No. 17—18. [Russ.] — 15) Ter-Grigorova, *Arbeit. a. d. Inst. f. Mikrobiol. u. Hyg.* „Mussabekov“. Aserbeidschan. Baku 1925—1926. Heft 2/3. [Russ.] — 16) Mudschiri, *Arbeit. a. d. zentralen Station f. Tropenmed. am Gesundheitsamt d. Transkaukas. Eisenbahn*. Tiflis 1927. Heft 1. [Russ.] — 17) Ter-Dschanian, *Ibid.* [Russ.] — 18) Semenov, *Turkestanski med. Journ.* 1925. No. 9. [Russ.] — 19) Skrjabin, *Russki Journ. Tropitscheskoi Med.* 1925. No. 1, 2, 3. [Russ. mit engl. Zusammenfassung]; *Prophylaktitscheskaia Med.* 1925. No. 9—10. [Russ.] — 20) Rajewskaja, *Russki Journ. Tropitscheskoi Med.* 1927. No. 1. [Russ. mit franz. Zusammenfassung.] — 21) Massalski, *Turkestanski Kraj* (Turkestaner Gebiet). (Rossija-Polnoje geographitsch. opisanie naschewo ottschestwa. Herausg. von W. P. Semenov-Tjanschanski. Bd. 19.) 1913. [Russ.]

Nachdruck verboten.

Zur Differenzierung virulenter und avirulenter Rotzkulturen mittels des Phänomens der Methylenblaureduktion.

(Aus dem Mil.-Veterinär-Bakteriologischen Laboratorium Nr. 1 U v o.)

Von Dr. B. M. Gurvitsch.

Die von Schardinger (1) angegebene Probe der Methylenblauentfärbung wird seit langem zur Qualitätsbestimmung der Milch angewandt. Diese Reaktion ist weiterhin von verschiedenen Untersuchern abgeändert worden, wobei sowohl das verwendete Reagens als auch die Versuchsanordnung selbst geändert wurden.

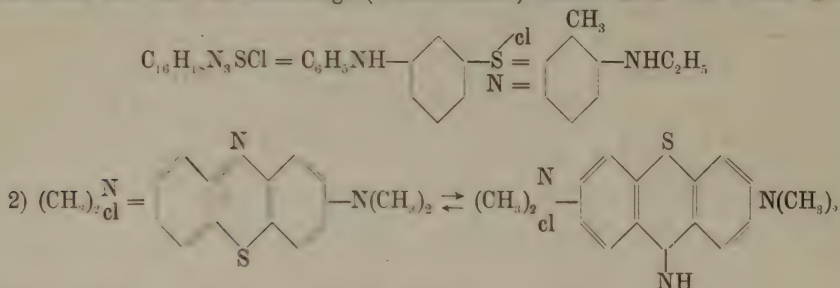
Die das Methylenblau reduzierenden Substanzen werden von einigen Autoren als zu Fermenten gehörend angesehen (Reduktase oder Redukase), von anderen aber Aldehyd-Kata-

1) In der Wechselrede über diesen Bericht machte Professor Skrjabin eine kurze Mitteilung über die Resultate seiner Expedition in Turkmenistan im Herbst 1926, während der 3000 Personen an der Linie der Mittelasiatischen Eisenbahn untersucht wurden. Die von dieser Expedition entdeckten Ankylostomiasisherde stimmen fast völlig mit den von uns angegebenen überein.

lase genannt. Nach Schardinger und Seligmann sind die Reduktasen keine Fermente sondern stellen vielmehr eine einfache Fähigkeit der lebenden Zellen dar, das Methylenblau zu entfärben. Ihnen stimmte Smith (2) bei, der festgestellt hat, daß die Reduktionskraft des Methylenblaus (= Mb)¹⁾ beim Stehenlassen der Milch zunimmt; im Gegensatz dazu ist Kulman (4) der Ansicht, daß die Methylenblau-reduktion nicht von der Menge der Mikroorganismen abhängt, während Orla-Jensen (5) annimmt, daß der Grad der Mb-Reduktion nicht von der Menge der in der Milch befindlichen Mikroben abhängig ist, sondern von ihrer Pathogenität.

Außer zur Prüfung von Milch wird das Methylenblau seit langem zu Reduktionsversuchen an Reinkulturen der verschiedensten Mikroben und an tierischen Geweben verwendet. Thunberg (6) arbeitete mit letzteren und konnte feststellen, daß die Mb-Reduktion ein Analogon zu dem fermentativen Zustand lebender Zellen beim Atmungsvorgange ist.

Die Mb-Reduktion ist in der Bakteriologie wiederholt studiert worden auf Grund zahlreicher Arbeiten (Smith [7], Carapelle [8], Cathcard und Hahn [9], Narburg und Meyerhof [10]) darf man annehmen, daß die Entfärbung des Mb durch die Mikroben nicht als Folge einer unspezifischen Reaktion, sondern ihres vitalen Prozesses zustande kommt, und daß die Mb-Reduktion mit der Bakterienmenge (Konzentration) Schritt hält. Der Prozeß der Mb-



Entfärbung findet statt bei der Atmung der Mikroben bei typischer Hydratation \rightleftharpoons Dehydratation der chinoiden Farbe zu einer benzoiden Leukobase (Mb erscheint als Wasserstoff-Akzeptor)²⁾ (Oppenheimer [22]). Mit anderen Worten: die Mb-Reduktion ist ein Indikator der Mikroben-atmung.

In der Folge gelang es Widmark (11) und Ahlgren, eine Abhängigkeit des Mb-Reduktionsphänomens von gewissen Grenzen festzustellen: Enzym-Zeitgesetz. Löffler und Riegler (12) studierten die Reduktionsstärke bei verschiedenen Bakterien der Typhus-Coli-Gruppe (die in verschiedenen Zuckernährböden kultiviert wurden) und fanden bei jeder Art von Bakterien einen ihr eigenen Koeffizienten, demgemäß diese Arten sich von einander differenzieren lassen.

L. Gozony und L. Suranyi (13) behandelten sensibilisierte Bakterien (*B. murimors*, *B. typhi murium*, *B. typhi abdom.*, *B. dysent.*) mit Bakteriophagen und kamen zu dem Schlusse, daß, ungeachtet der Abhängigkeit der Mb-Reduktion von der Konzentration sensibilisierter Bakterien, die Versuchsergebnisse dennoch gestatten, die Anwesenheit eines Bakteriophagen in der zu untersuchenden Flüssigkeit auf Grund von Abweichungen der Kurve festzustellen. Zu den gleichen Resultaten hinsichtlich der diagnostischen Bedeutung der Mb-Reduktion bei Anwesenheit von Bakteriophagen kommt auch Schwartzmann (14). Bei der Differenzierung von pathogenen und nicht-pathogenen Streptokokken hält die Probe der Mb-Reduktion ihren Platz unter anderen Methoden der Pathogenitätsuntersuchung dieser Mikroben auf Grund ihrer kulturellen Eigenschaften.

In dieser Hinsicht gibt es bei einigen Autoren Widersprüche. So konnten z. B. Ayers, Johnson und Mudge (15) im Gegensatz zu Schermann und Albus (15) zu keinen bestimmten Resultaten kommen bei der Differenzierung von pyogenen Streptokokken und Saprophyten mittels der Mb-Reduktion. Das nämliche finden wir in der Arbeit von M. Klimmer und H. Haupt (16), welche die Resultate ihrer Untersuchungen an pyogenen und nichtpyogenen Streptokokken in Form nachstehender Tabelle wiedergeben.

Strept. pyog. equi	Reduktion in 18 Std. (Mbmilch)
Strept. abort. equi	Reduktion in 18 Std. "
Streptoc. equi	keine Reduktion "
Strept. ov. lactis	Reduktion in 18 Std. "
Streptoc. agalactiae	keine Reduktion "

Schwartz (17) wandte ebenfalls die Mb-Reduktion bei der Bestimmung der Pathogenität eines von ihm bei einer Ferkelepizootie isoliertem Streptokokkus an. Zoltan (18) und Zoltan und Gaydos (19) arbeiteten mit verschiedenen Arten von Mikroben, die hauptsächlich der Coli-Typhus-Gruppe angehörten, und stellten auf Grund der verschiedenen Schnelligkeit

1) Mb (Methylenblau) ist ein Tetramethylthioninchlorid mit der Formel:

der Mb-Entfärbung eine Abhängigkeit des Reduktionsgrades von der Virulenz des Stammes fest. Sie schlugen diese Methodik zur Diagnostik verschiedener Mikrobenarten vor. In Bezug auf Staphylokokken liegt eine Arbeit von Lesbre und Jausion (20) vor, die auch einen Zusammenhang zwischen der Stärke der Mb-Reduktion und der Virulenz der Stämme fanden und eine Reduktionsmethode zur Auswahl virulenter Staphylokokkenstämme und zur Prognosestellung bei Pyodermatiden empfahlen. Schließlich schlug Thomas Binetti die Mb-Reduktion zur Serodiagnostik des Krebses vor, über deren Mechanismus unlängst eine Arbeit von Mondain, Douris und Beek (21) erschienen ist.

Eigene Untersuchungen.

Vorliegende Arbeit verfolgte das Ziel, die Reaktionsfähigkeit von Rotzkulturen zu untersuchen und mittels der Reduktionsstärke virulente Stämme von avirulenten zu differenzieren. Die Arbeit wurde an 31 uns zur Verfügung stehenden *B. mallei*-Stämmen durchgeführt; um den Umfang des Artikels zu verringern, teilen wir nur Versuche an 3 Stämmen mit, das sind: „Nr. 5“, „Nr. 5584“ und „2. Vakzine von K o n e w“.

Der *B. mallei*-Stamm „Nr. 5584“ wird in G.I.E.V. zur Herstellung von Mallein und in V.M.I.R.K.K.A. zur Bereitung von Rotzantigen angewandt, welches letzteres zur Komplementbindung bei der Untersuchung von Pferden auf Rotz dient. Dieser Stamm wurde im Kreis-Mil.-Veter. Bakteriolog. Laboratorium Nr. 1 U v o an Katzen und Meerschweinchen nachgeprüft und tötete diese Tiere regelmäßig, wobei *B. mallei* aus ihnen wieder in Reinkultur isoliert wurde.

Der Stamm „2. Vakzine von K o n e w“ ist agglutinabel; man gebraucht ihn zur Herstellung einer Bakterienaufschwemmung für die an Pferden vorzunehmende Agglutinationsreaktion auf Rotz. Dieser Stamm tötet Katzen ausnahmslos, wobei *B. mallei* wieder in Reinkultur gewonnen wird. Meerschweinchen bleiben am Leben.

Der *B. mallei*-Stamm „Nr. 5“ ist als avirulent anzusehen, da es weder gelingt, Katzen auf ihm zu töten noch Rotzbazillen zu isolieren, falls die Katzen zugrunde gehen. Meerschweinchen werden überhaupt nicht dadurch getötet.

Nach dieser kurzen Charakteristik der *B. mallei*-Stämme, mit denen wir hauptsächlich zu arbeiten hatten, gehen wir zu den eigentlichen Untersuchungen über.

Versuch Nr. 1.

Zunächst begannen wir die reduzierenden Eigenschaften der Rotzkulturen gegenüber Methylenblau mit dem Reagens von Schardinger (5 ccm einer gesättigten alkohol. Mb.-Lösung, 5 ccm 40proz. Formalin und 190 ccm Aqu. dest.) zu untersuchen. Das Reagens wurde vor dem Gebrauch sterilisiert. Die 3 oben genannten *B. mallei*-Kulturen wurden einzeln auf je 4,5 ccm eines gewöhnlichen und 3 Proz. Glycerin enthaltenden Fleischbrühe-Pepton-Nährbodens verimpft. Genau 48 Std. danach wurde mit sterilen Pipetten und unter sterilen Bedingungen 0,5 ccm Schardingers Reagens hinzugefügt (was 0,01 Proz. Mb. im Verhältnis zu der ganzen Flüssigkeit ausmacht. Das Gemisch wurde durchgeschüttelt und gleich darauf eine 1,5–2 cm hohe Schicht sterilen Vaselineöls darauf gegossen. Die Probiergläser kamen alsdann in ein Wasserbad von 45–47°. Aus Tab. Nr. 1 ist ersichtlich, daß das Methylenblau nach 10 Min. in dem Probierglas, das *B. mallei*-Kultur „Nr. 5“ enthielt, völlig entfärbt wurde. Was die Stämme „2. Vakzine von K o n e w“ und „Nr. 5584“ anlangt, so zeigten sie keinerlei Spuren einer Mb.-Reduktion.

In der Annahme, daß Formalin (wovon Schardingers Reagens nur 2,5 Proz. enthält) die Reduktionsfähigkeit der *B. mallei*-Stämme „2. Vakzine von K o n e w“ und „Nr. 5584“ unterdrückt, gingen wir dazu über, ihre Re-

Tabelle I.

Stamm	Reduktionsgrad nach					Anmerkungen
	5 Min.	10 Min.	20 Min.	45 Min.	1 Std.	
Nr. 5	2	5	5	5	5	Der Reduktionsgrad ist mit 5 Ball. bezeichnet, wobei 1 den Anfang der Reduktion, 5 = völlige Entfärbung und 0 = gänzliches Ausbleiben der Reduktion bedeuten.
2. Vacc.	0	0	0	0	0	
Nr. 5584	0	0	0	0	0	

duktionsfähigkeit mit dem nämlichen, aber formalinfreien Reagens zu bestimmen (das Reagens bestand aus 5 ccm einer gesättigten alkohol. Mb.-Lösung und 195 ccm Aqu. dest.).

Versuch Nr. 2.

Gewöhnliche Fleischbrühe-Pepton-Nährböden (Gesamtmenge 4,5 ccm) wurde mit „Nr. 5“, „2. Vakzine von K o n e w“ und „Nr. 5584“ beimpft. Nach 48 Std. wurde 0,5 ccm des formalinfreien Reagens zu den Bouillonkulturen gegeben; die Probiergläser wurden geschüttelt und mit einer 2 cm dicken Schicht von Vaselineöl überschichtet. Die Reduktionsprobe kam alsdann in ein Wasserbad von 45–47°. Die Ergebnisse sind aus Tab. Nr. II ersichtlich.

Tabelle II.

Stamm	Reduktionsgrad der verschiedenen Zeitspannen				
	5 Min.	10 Min.	20 Min.	45 Min.	1 Std.
Nr. 5	5	5	5	5	5
2. Vacc.	3	5	5	5	5
Nr. 5584	0	1	2	3	4

Wir sehen also, daß eine 48stünd. Kultur des Stammes „Nr. 5“ das Mb. in 5 Min. vollständig entfärbt, die „2. Vakzine“ in 10 Min., der Stamm „Nr. 5584“ dagegen erst in 1 Std. und unvollständig. Daraus folgt, daß die Mb.-Reduktion am schnellsten in der Bouillonkultur des avirulenten Stammes, weniger rasch in der der „2. Vakzine“ vor sich geht, während der Stamm „Nr. 5584“ nur schwach reduziert, d. h. die Abschwächung der Reduktion hängt direkt von der Virulenz des Stammes ab.

Versuch Nr. 3.

48stünd. Kulturen derselben Stämme auf einem Fleischbrühe-Pepton-Nährboden wurden $1\frac{1}{2}$ Std. vor dem Zusatz von Schardingers Reagens mit 3 Tropfen Toluol versetzt; in einer anderen Serie wurde das gleiche, aber formalinfreie Reagens bei der nämlichen Versuchsanordnung wie in den Versuchen Nr. 1 und 2 beigelegt. In keinem Falle trat eine Reduktion in den Bouillonkulturen ein. Darauf filtrierten wir durch einen Berkefeld-Filter 72stünd. Rotzkulturen der Stämme „Nr. 5“, der „2. Vakzine“ und „Nr. 5584“; auch die Filtrate dieser 3 Stämme zeigten keine reduzierenden Eigenschaften gegenüber schwachen Mb.-Lösungen. Endlich wurde das Ausbleiben der Mb.-Reduktion auch an 48stündigen durch Hitze abgetöteten Bouillonkulturen aller 3 Stämme festgestellt.

Versuch Nr. 3 zeigt, daß Toluol die Reduktion aufhält. Filtrate aus Rotzkulturen und abgetötete Kulturen reduzieren Mb. ebenfalls nicht. Das alles

deutet darauf hin, daß es uns nicht gelungen ist, reine Fermente als solche in Rotzkulturen nachzuweisen; das wird indirekt durch das Vorhandensein einer stärkeren Mb.-Reduktion bei Anwendung eines formalinfreien Reagens bewiesen (vgl. Versuche Nr. 1 und 2); 0,25 Proz. Formalin schwächt die Lebensfähigkeit der Mikroben ab, demzufolge die Mb.-Reduktion abnahm oder gänzlich aufhörte.

Versuch Nr. 4.

Da Ahlgren und auch Meyerhof in ihren Arbeiten darauf hingewiesen haben, daß die zur Probe verwendete Methylenblaumenge die Versuchsergebnisse beeinflußt und schon eine 0,005proz. Methylenblaukonzentration die Atmung lebender Staphylokokken hemmt, so gingen wir bei diesem Versuch zur Anwendung des folgenden Reagens mit sehr schwacher Mb.-Konzentration über; 2 Tropfen = 0,08 ccm einer 0,25proz. Mb.-Lösung in Aqu. dest. wurden zu 48stünd. Kulturen aller 3 Stämme hinzugefügt, was 0,004 Proz. der gesamten Flüssigkeit ausmacht.

Wie es auch zu erwarten war, ging infolgedessen die Mb.-Reduktion rascher vor sich als bei einer Reaktion mit stärkerer Mb.-Konzentration; auch hier ließ sich das nämliche beobachten: Der avirulente Stamm „Nr. 5“ ergab eine schnelle Entfärbung und die Stämme „2. Vakzine“ und „Nr. 5584“ eine schwache

Versuch Nr. 5.

Bei diesem Versuche wurde der Reduktionsgrad mittels einer sehr stark konzentrierten, nämlich einer 1proz. Lösung von Methylenblau in Aqu. dest. bestimmt.

0,5 ccm dieser Lösung wurde zu 48stünd. Bouillonkultur aller 3 Stämme hinzugefügt. Ergebnis: Während der 1. Std. des Aufenthaltes der Proben im Wasserbad bei 45—47° trat in keiner der Proben eine Reduktion ein. Als die Proben sodann in den Brutschrank bei 37° gestellt wurden, setzte die Mb.-Entfärbung in der Kultur „Nr. 5“ nach 3 Std. ein und wurde nach 15—18 vollständig. In den Kulturen „2. Vakzine“ und „Nr. 5584“ wurde keine Spur einer Reduktion wahrgenommen (die Beobachtung dauerte 1 Monat lang).

Versuch Nr. 6.

Zum Versuch dienten 48stünd. Bouillonkulturen von denselben *B. mallei*-Stämmen. Dazu wurde eine 1proz. wässrige Mb.-Lösung in verschiedenen Mengen — 1—10 Tropfen — gegeben. Die Proben wurden in den Brutschrank gebracht.

Tabelle IV.

Zahl der Tropfen einer 1proz. Mb.-Lösung	Reduktionsgrad nach verschiedenen Zeitspannen			
	1 Std.	2 Std.	3 Std.	8 Std.
1 Tropfen	5	5	5	5
2 „	5	5	5	5
3 „	5	5	5	5
4 „	5	5	5	5
5 „	4	5	5	5
6 „	3	5	5	5
7 „	2	4	5	5
8 „	2	4	5	5
9 „	1	3	4	5
10 „	1	3	4	5

Ergebnis: Während einer 72stünd. Beobachtungsdauer ließen die Stämme „2. Vakzine“ und „Nr. 5584“ keinerlei reduzierende Eigenschaften erkennen; was den Stamm „Nr. 5“ anlangt, so zeigt Tab IV die Resultate der Entfärbung.

Versuch Nr. 7.

Zum Versuch wurden konzentrierte Kulturen von den nämlichen *B. mallei*-Stämmen genommen, welche in 3proz. Glycerin-Fleischbrühe-Pepton-Nährboden im Laufe von 2 Mon. (zur Herstellung von Mallein) gezüchtet worden waren. Je 4,5 cem der Bouillonkulturen wurden steril in Probiergläser gegossen, dazu wurde 0,25, 0,5 und 1,0 cem einer 1proz. Mb.-Lösung gegeben und darauf Vaselineöl geschichtet. Ergebnis: Die Mb.-Reduktion trat etwa gegen Ende der ersten 24 Std. nur in Probiergläsern mit den Kulturen des Stammes „Nr. 5“ ein, in denen 0,5 und 0,25 cem einer 1proz. Mb.-Lösung enthalten waren; in den übrigen Probiergläsern fand keine Reduktion statt.

Versuch Nr. 8.

Von einem 3 Proz. Glycerin enthaltenden Fleischbrühe-Pepton-Nährboden wurden je 4,5 cem in Probiergläser abgefüllt; sodann wurden 0,05 cem (d. h. 0,01 Proz. der Gesamtmenge der Flüssigkeit) einer 1proz. Mb.-Lösung hinzugefügt. Der resultierende, dunkelblau gefärbte Glycerin-Fleischbrühe-Pepton-Nährboden wurde sterilisiert und mit den 3 Stämmen einzeln beimpft. Die Proben kamen in den Brutschrank. Ergebnis: Im Laufe von 24 bis 30 Std. wurde das Mb. vollständig durch den Stamm „Nr. 5“ entfärbt. Die Stämme „2. Vakzine“ und „Nr. 5584“ zeigten während einer 20tägigen Beobachtungszeit keine Reduktion.

Auf Grund aller dieser Beobachtungen läßt sich schließen, daß in den Reduktionsproben das Versuchsergebnis von der Konzentration des Mb. beeinflusst wird; der avirulente *B. mallei*-Stamm „Nr. 5“ entfärbt indes das Mb. regelmäßig schnell und vollkommen, während es von den Stämmen „2. Vakzine“ und „Nr. 5584“ langsam oder überhaupt nicht entfärbt wird. Unseres Erachtens kann dieser Umstand einer Differenzierung virulenter *B. mallei*-Kulturen von avirulenten dienen, wenn unsere Ergebnisse durch weitere Beobachtungen bestätigt werden sollten.

* * *

Wir zogen weiterhin die Intensität sowie die Art des Wachstums eines jeden *B. mallei*-Stammes in Betracht und konstatierten dabei, daß der *B. mallei*-Stamm „Nr. 5“ sehr üppig auf gewöhnlichem und glyzerinhaltigem Fleischbrühe-Pepton-Nährboden wächst, wobei er letzteren sehr stark trübt und ein dickes Häutchen an der Bouillonoberfläche bildet, während die Stämme „2. Vakzine“ und „Nr. 5584“ in denselben Nährböden nur eine leichte Trübung und einen geringfügigen schleimigen Niederschlag hervorrufen, ohne ein Häutchen zu bilden. Dieser Umstand, im Verein mit den Literaturangaben von Smith (2), Gozony und Suranyi (13), Mondain, Douris u. Beck (21) u. a., nach denen der Reduktionsgrad von der Menge der zum Versuch verwendeten Mikroorganismen abhängt, bewog uns, weitere Versuche vorzunehmen, um den Reduktionsgrad des Mb. durch alle drei gleichstark konzentrierten *B. mallei*-Stämme festzustellen. Zu diesem Zweck impften wir unsere Rotzkulturen auf 3proz. Glycerin-Fleischbrühe-Agar und schwemmten nach 48 Std. die Kulturen mit sterilem 3proz. Glycerin-Fleischbrühe-Pepton ab; die mit derselben Bouillon hergestellten Emulsionen brachten wir zu einer gleichen Konzentration (wobei eine agglutinierende *B. mallei*-Suspension als Standard diente).

Versuch Nr. 9.

Emulsion in 3proz. Glycerin-Fleischbrühe-Pepton. Die Konzentration der Emulsion ist gegenüber der Standardlösung eine 20fache. In jedes Probierglas wurden 4,5 cem der Emulsion eines der Stämme gebracht, alsdann wurden 0,5 cem einer 1proz. Mb.-Lösung hinzugefügt und darauf Vaselineöl aufgegossen. Die Probiergläser wurden in steriler Weise beschickt und in den Brutschrank bei 37° gebracht. Die Versuchsergebnisse sind in Tab. Nr. V wiedergegeben.

Tabelle V.

Stamm	Reduktionsgrad nach			
	3 Std.	5 Std.	18 Std.	48 Std.
Nr. 5	5	5	5	5
2. Vaccine	4	4	3	3
Nr. 5584	4	4	4	3

Wie aus dieser Tabelle ersichtlich, trat eine vollständige Reduktion nur bei dem *B. mallei*-Stamm Nr. „5“ ein.

Versuch Nr. 10.

Emulsion in 3proz. Glycerin-Fleischbrühe-Pepton-Nährboden, Konzentration 20fach gegenüber der Standardkultur. Gebraucht wurden: 1) Scharldingers Reagens, 2) das nämliche, aber formalinfreie Reagens, 3) eine 0,25proz. wässrige Mb.-Lösung und 4) eine 1proz. Mb.-Lösung. Der Versuch wurde im Wasserbade durchgeführt. Resultate auf Tab. Nr. VI.

Tabelle VI.

Reagens	Stamm	Reduktionsgrad nach					Konzentration des Mb im Verhältnis zur gesamten Flüssigkeitsmenge
		5 Min.	10 Min.	20 Min.	45 Min.	1 Std.	
Reagens von Scharldinger	Nr. 5	1	3	5	5	5	0,01 %
	2. Vacc.	0	2	3	3	3	
	Nr. 5584	0	4	4	4	4	
Dasselbe Reagens, aber formalinfrei	Nr. 5	3	5	5	5	5	0,01 %
	2. Vacc.	3	5	5	5	5	
	Nr. 5584	0	0	1	3	3	
0,25proz. wässrige Mb.-Lösung	Nr. 5	2	4	5	5	5	0,025 %
	2. Vacc.	3	5	5	5	5	
	Nr. 5584	4	4	5	5	5	
1proz. wässrige Mb.-Lösung	Nr. 5	0	0	0	0	2	0,1 %
	2. Vacc.	0	0	0	0	1	
	Nr. 5584	0	0	0	0	0	

Versuch Nr. 11.

Aus den Rotzkulturen „Nr. 5“, „2. Vakzine“ und „Nr. 5584“ wurde in der gleichen Weise wie in obigen Versuchen eine dicke Stammemulsion zubereitet, deren Konzentration 20mal die der Standardkultur übertraf: Mittels einer 3proz. Glycerin-Pepton-Bouillon wurden aus der Stammemulsion folgende Verdünnungen einer verschiedenen konzentrierten Emulsion hergestellt: 1) 6 cem

der unverdünnten Emulsion, 2) 4 cem der Stammemulsion + 2 cem Fleischbrühe-Pepton, 3) 2 cem Emulsion + 4 cem Fleischbrühe-Pepton, 4) 1 cem Emulsion + 5 cem Fleischbrühe-Pepton, 5) 0,5 cem Emulsion + 5,5 cem Fleischbrühe-Pepton, 6) 0,2 cem Emulsion + 5,8 cem Fleischbrühe-Pepton.

Zu jedem der 3 in dieser Weise verdünnten Stämme wurde 0,1 cem (0,25 Proz.) einer Mb.-Lösung in Aqu. dest. und sodann steriles Vaselineöl hinzugegeben (das Abfüllen wurde in steriler Weise besorgt).

Der Versuch wurde im Wasserbade durchgeführt. Während einer 2stünd. Beobachtungsfrist zeigten alle 3 Stämme in allen Probierröhrchen keinerlei Unterschiede im Reduktionsgrade; der durch diese Kulturen herbeigeführte Reduktionsgrad des Mb. war bei ein und derselben Konzentration der Emulsion nach der nämlichen Zeitspanne fast der gleiche, was man aus Tab. Nr. VII, die als Beispiel dieses Versuchs angeführt wird, ersieht.

Weiterhin wurden bei diesem Versuch alle Proben mit verschiedenen verdünnten Emulsionen der 3 Stämme in den Brutschrank (37°) gestellt. Es zeigte sich, daß der Stamm „Nr. 5“ in allen seinen Verdünnungen gegen Ende der ersten 24 Std. das Mb. vollständig entfärbt hatte, während die Stämme „2. Vakzine“ und Nr. „5584“ keine weitere Reduktion des Mb. herbeiführten. Die Reduktion blieb nach 24 und 48 Std., als die Probe schon im Brutschrank stand, dieselbe, wie sie 2 Std. nach dem Versuchsbeginn gewesen war.

Tabelle VII.

Stamm	Verdünnung	Reduktionsgrad nach verschiedenen Zeitspannen								
		5 Min.	10 Min.	15 Min.	20 Min.	25 Min.	40 Min.	1 Std.	1½ Std.	2 Std.
Nr. 5	unverdünnt	2	4	5	5	5	5	5	5	5
	4. Verdünnung 1 + 5	0	0	0	1	1	3	3	3	3
	6. Verdünnung 0,2 + 5,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2. Vacc.	unverdünnt	3	4	5	5	5	5	5	5	5
	4. Verdünnung	0	0	0	1	1	3	3	3	3
	6. Verdünnung	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nr. 5584	unverdünnt	2	4	4	5	5	5	5	5	5
	4. Verdünnung	0	0	0	0	1	1	2	3	3
	6. Verdünnung	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Es ließ sich endlich noch eine Tatsache beobachten, nämlich, daß in den Kulturen der Stämme „2. Vakzine“ und „Nr. 5584“ nach 48 Std. eine der Reduktion entgegengesetzte Erscheinung (eine Dereduktion des Mb.), d. h. eine Oxydation des Methylenblaus, das Auftreten einer grünen, dann blauen und endlich dunkelblauen Färbung im Laufe der nächsten 2—3 Wochen eintrat.

Was aber den Stamm „Nr. 5“ anlangt, so bleibt das von ihm einmal reduzierte Methylenblau monatelang entfärbt. Das nämliche hatten wir auch zu beobachten Gelegenheit nach Zusatz von 0,5 cem einer 1proz. wässrigen Mb.-Lösung zu der Emulsion aller dieser Stämme. War die Mb.-Lösung durch den Stamm „Nr. 5“ reduziert, so wurde sie auch bei monatelangem Aufenthalt im Brutschrank nicht oxydiert. Das durch die Stämme „2. Vakzine“ und „Nr. 5584“ unvollkommen reduzierte Mb. erreicht in 2—3 Tagen allmählich seine frühere dunkelblaue Färbung.

In vorliegender Arbeit haben wir nicht die Möglichkeit, näher auf eine ganze Reihe von Nachprüfungsversuchen und Beobachtungen einzugehen, welche wir sowohl mit denselben als auch mit einer ganzen Reihe anderer Rotzkulturen durchgeführt haben. Wir wollen nur hervorheben, daß wir die gleichen Resultate, wie sie obige Versuche gezeigt hatten, auch bei Experimenten an 28 *B. mallei*-Kulturen erhielten. Auf Grund dieser Arbeit stellte sich bei den ersten 4 Stämmen (Nr. 8, 36, 56, 457) ein dem avirulenten Stamm „Nr. 5“ gleichartiges Verhalten heraus, während die übrigen sich wie „Nr. 5584“ verhielten.

Schlußfolgerungen.

1) Virulente und avirulente *B. mallei*-Kulturen reduzieren starke und schwache Konzentrationen des Methylenblau nicht in gleichem Maße, was sich auf verschieden üppiges Wachstum auf flüssigem Nährboden (Fleischbrühe-Pepton) zurückführen läßt. — 2) Der Unterschied zwischen avirulenten und virulenten *B. mallei*-Kulturen tritt am deutlichsten bei stark konzentriertem Mb. in Erscheinung. — 3) Der Reduktionsgrad des Mb. steht in direkter Abhängigkeit von der Konzentration der Rotzbazillen. — 4) Schardingers Reagens, das 2,5 Proz. Formalin enthält, unterdrückt die Mb.-Reduktion, Toluol hebt sie gänzlich auf. — Filtrate aus Rotzbazillen und durch Erhitzen abgetötete Kulturen besitzen keine reduzierenden Eigenschaften. — 5) Die unter 4) dargelegten Tatsachen weisen indirekt darauf hin, daß das Mb. beim Akt der Atmung (fermentativer Vorgang) reduziert wird. Fermente ließen sich nicht nachweisen. — 6) Bei der Reduktion von Mb. durch einen avirulenten Stamm bleibt die Entfärbung monatelang unverändert; das durch virulente Stämme teilweise oder vollständig reduzierte Mb. wird aber allmählich oxydiert, d. h. es nimmt seine frühere dunkelblaue Färbung wieder an.

Zum Schluß sei an dieser Stelle dem wissenschaftlichen Mitarbeiter des Ukrainischen Instituts für Angewandte Chemie, Herrn G. L. Einhorn, verbindlichst gedankt für die Ratschläge und die Hilfe, die er mir bei der Durchführung dieser Arbeit angedeihen ließ.

Literaturverzeichnis.

- 1) Chemische Technologie des Gärungsgewerbes, der Nahrungs- und Genußmittel. Dr. F. Hayduck, 1922, 2. Halbbuch. — 2) Hyg. Rundschau. 1904. — 4) Biochem. Ztschr. 1911. — 5) Milchtztg. Bd. 39. 1910. — 6) Skand. Arch. f. Physiol. Bd. 35. 1917. S. 163. — 7) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 19. S. 181. — 8) Ebenda. Bd. 47. — 9) Arch. f. Hyg. Bd. 44. 1902. S. 295. — 10) Pflügers Arch. Bd. 148. 1912. S. 297. — 11) Skand. Arch. f. Phys. Bd. 41. 1921. S. 206. — 12) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 99. S. 1. — 13) Ebenda. Bd. 95. S. 353. — 14) Ebenda. Bd. 101. S. 62. — 15) Zit. nach Klimmer und Haupt (16). — 16) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 101. S. 126. — 17) Ebenda. S. 148. — 18) Ebenda. Bd. 96. S. 170. — 19) Ebenda. S. 167. — 20) Compt. rend. Soc. de Biol. T. 94. p. 586. 21) Ann. Inst. Pasteur. 1926 Nr. 5. — 22) Die Fermente und ihre Wirkungen. 1924—1926. S. 1389.

Nachdruck verboten.

Ueber Jodaufspeicherung und Jodbindung durch die Muskeltrichinellen¹⁾.

[Aus dem histologisch-embryologischen Institut der Universität Lwów
(Direktor: Prof. Dr. Władysław Szymonowicz).]

Von **Bernard Eug. Kalwaryjski.**

Mit 1 Tafel.

I.

Gelegentlich meiner unter Mitwirkung von Frl. Stanisława Herman ausgeführten experimentellen Untersuchungen²⁾ an einigen Nematodenarten wurde eine starke Affinität aller untersuchten Rundwürmer gegen freies Jod festgestellt.

Die Rundwürmer färben sich auffallend stark mit Jod, sei es, daß eine Jodtinktur, eine Lugolsche oder von mir vielfach geprüfte Jod-Jodkalziumlösung angewendet wurde. Diese Jodaufspeicherung scheint von dem Glykogengehalt abhängig zu sein; jedoch soll ausdrücklich hervorgehoben werden, daß auch andere Komponenten des Nematodenkörpers das freie Jod an sich reißen, wobei an erster Stelle die Fettablagerungen genannt werden sollen.

Alle bisher untersuchten Nematodenarten zeigen gegen Jodlösungen folgendes Verhalten: es tritt eine rapide Jodaufnahme durch den ganzen Körper ein, und die Würmer nehmen sogar in ziemlich dünnen Lösungen eine tiefe braunschwarze Färbung an. Auf diese Weise behandelte Nematoden weisen große Unterschiede bezüglich der Haltbarkeit der Jodtinktur auf: die einen behalten ihre charakteristische Tinktur mehrere Wochen bei, die anderen dagegen verlieren die tiefbraune Färbung in wenigen Tagen und bleiben hellgelb gefärbt lange Zeit. Die Haltbarkeit der Tinktion scheint durch den Fettgehalt und die Fettart bedingt zu sein.

An isolierten Muskeltrichinellenkapseln, welche einer Einwirkung der 20fach verdünnten Lugolschen Lösung überlassen und in Glycerin eingeschlossen wurden, konnte man nach wenigen Stunden feststellen, daß die Kapseln ihre braune Tinktion eingebüßt hatten, wogegen die Trichinellen braunrötlich hervortraten.

Trichinellenhaltige und mit Jodlösungen behandelte Gefrierschnitte oder Quetschpräparate entfärben sich in Glycerin auffallend unregelmäßig, wobei die Differenzierung selbst unberechenbar protrahiert wird.

Tritt endlich Entfärbung des Muskelgewebes ein, so sind die Muskelfasern ganz farblos, die Kapseln schimmern ziemlich undeutlich durch, nur die Trichinellen treten deutlich hervor.

Selbst undifferenzierte und in Glycerin eingeschlossene Muskelgewebestücke geben das freie Jod in die Umgebung ab, die Trichinellen bleiben tingiert, aber das Präparat nimmt ein kontrastarmes und schmieriges Aussehen an.

1) Eingegangen am 6. Juli 1927.

2) Veröffentlicht am 28. März 1927 in der wissenschaftlichen Sitzung der poln. biol. Gesellsch. in Lwów. Die Abhandlung erscheint demnächst im Druck.

Um alle diese Nachteile zu überwinden, wurde folgender Weg eingeschlagen: die trichinellenhaltigen Fleischproben verweilen 1—2 Std. in Jod-Jodkalzium- bzw. Jodkalzium-Lösung von folgender Zusammensetzung: Jodum pur. 1 g Kalzium- bzw. Kalium Jodatum 2 g Aqua destill. 100 ccm. Zur weiteren Behandlung kommen entweder schon vorher vorbereitete und jodierte Quetschstücke von dem trichinösem Fleisch, oder — was viel vorteilhafter erscheint — man verfertigt bis 200 μ dicke Gefrierschnitte aus den jodierten Fleischproben.

Die Schnitte bzw. Quetschstücke kommen in eine 2,5proz. Natriumthiosulfatlösung, um das überschüssige Jod aus dem Gewebe zu entfernen. Die Differenzierung ist in dem Momente vollendet, wenn die Muskelfasern vollständig farblos erscheinen; sie bilden einen weißen Hintergrund für die tiefbraunen und mit unbewaffnetem Auge kaum sichtbaren Trichinellen. Ohne genügende Erfahrung ist es angezeigt, den Differenzierungsprozeß mikroskopisch zu kontrollieren. Die ca. 200 μ dicken Gefrierschnitte verlieren in Natriumthiosulfatlösung die charakteristische Jodtingierung in wenigen Minuten. Tritt die Entfärbung der Muskelfasern ein, so müssen die Muskelschnitte — bzw. Quetschstücke — schnell und gründlich mit destilliertem Wasser ausgewaschen werden, um jede Spur des Natriumthiosulfats zu entfernen, da sonst sehr früh die Jodtingierung der Trichinellen verschwindet.

Werden so behandelte Präparate in Glyzerin eingeschlossen, so liefern sie ein außerordentlich klares Bild, in welchem jedoch die feineren Strukturverhältnisse der Trichinellenumgebung sehr schwach zu Tage treten (Taf. I, Fig. 1).

Um die strukturellen Einzelheiten der Kapsel und ihrer Umgebung deutlich hervortreten zu lassen, wurde eine — in diesem Falle — kontrastvolle Nachfärbung mit Delafieldschen Hämotoxylin oder Mayers Hämalaunlösung vorgenommen. Nachher werden die Schnitte — wie üblich — in Leitungswasser gründlich ausgewaschen, in Glyzerin aufgeheilt und eingeschlossen.

Das Resultat ist folgendes: die Muskelfasern sind hellblau, die Kerne tiefblau, die Trichinellenkapseln sehen etwas matt aus und zeichnen sich von der Umgebung durch eine tiefere Tingierung aus.

Die Trichinellen sind hellbraun bis mahagonirot gefärbt und etwas geschrumpft was an dem Verhalten des Kapselinhaltes und des Trichinellenkörpers deutlich erkennbar ist (Taf. I, Fig. 2, bei „b“). Diese unbedeutende Schrumpfung übt keinen ungünstigen Einfluß auf die Klarheit des mikroskopischen Bildes aus.

II.

Die theoretische Begründung dieses Tinktionsergebnisses beruht auf einfachen Tatsachen, welche jetzt zur Besprechung gelangen sollen. — Die lebenden Muskeltrichinellen (auch Darmtrichinellen) sind sowohl in ungekapseltem, als auch in eingekapseltem Zustande außerordentlich glykogenreich, was schon längst festgestellt wurde¹⁾ und von mir ebenfalls bestätigt werden kann.

Im Gegensatz zu dem Verhalten der verschiedenen freilebenden und schmarotzenden Rundwürmerarten, sind die Muskeltrichinellen an Fettsubstanzen arm: man ist nicht imstande, die Trichinellen mit irgendwelchem Fettfarbstoff elektiv zu färben. Diese Fettarmut erwies sich als bedeutungsvoll für die Biologie der Trichinellen, hier aber kann auf diese Tatsache nicht näher eingegangen, nur ihre Wichtigkeit soll betont werden.

1) Flury, Ferd., Arch. f. exper. Path. u. Pharmak. Bd. 37. 1913. S. 175 ff.

Das trichinöse Muskelgewebe besitzt eine Eigentümlichkeit, welcher eine grundlegende Bedeutung für das Zustandekommen der Jodaufspeicherung durch die Muskeltrichinellen zugeschrieben werden muß. Diese Eigentümlichkeit beruht auf einer selbstverständlichen Tatsache, nämlich darauf, daß das tote Gewebe ein lebendes Material beherbergt.

Das Muskelgewebe des Wirttieres verliert sehr bald nach dem Tode sein Glykogen, wogegen die in Muskelfasern ruhenden und lebenden Trichinen das Glykogen beibehalten.

In das Muskelgewebe eindringendes Jod wird durch die glykogenreichen Trichinellen gespeichert, wobei jedoch die Würmer sofort abgetötet werden. Das Jod wird an das Glykogen der Trichinellen gebunden und ziemlich dauernd fixiert.

Nach Jodbehandlung erscheint das Muskelgewebe samt Kapseln und Trichinellen diffus braunschwarz tingiert; kommt es in Natriumthiosulfatlösung, so folgt in wenigen Min. völlige Entfärbung der Muskelfasern, sobald sie kein Glykogen mehr enthalten.

Das nicht gebundene Jod wird durch Natriumthiosulfat zu Natriumjodid reduziert; die Trichinellen aber, welche durch ihren Glykogengehalt das freie Jod gebunden haben, behalten ihre tiefbraune Tingierung bei. Bleiben die Präparate eine zeitlang in Natriumthiosulfatlösung nach endgültiger Entfärbung der Muskelfasern liegen, so wird noch ziemlich lange die Jodtingierung der Trichinellen beibehalten, was für eine starke Bindung der Jodmoleküle spricht.

Ganz natürlich kommt es schließlich unter solchen Bedingungen zu einer völligen Entfärbung der Trichinellen.

Wiederholt man jetzt die ganze Färbungsprozedur mit einmal völlig entfärbtem Material, so läßt die Methode im Stich und eine elektive Jodaufspeicherung der Trichinellen gelingt unvollkommen oder überhaupt nicht mehr. Diese Tatsache findet eine Erklärung unter der Annahme, daß die spezifische Jodtinktion der Muskeltrichinellen auf ihren Glykogendepot beruht. Es ist anzunehmen, daß die Glykogenjodverbindung in dem Trichinellenkörper entweder ganz oder in sehr hohem Grade wasserunlöslich ist, wogegen das von Jod befreite Glykogen der abgetöteten Tiere leicht solcher unumkehrbaren Umsetzung unterliegt, die keine mit Jod tingbaren Produkte liefert.

Für diese Annahme spricht folgender Versuch: man fixiert zwei Quetschstücke des trichinösen Muskelgewebes in Carnoyscher Flüssigkeit, welche bekanntlich zu den besten Fixierungsflüssigkeiten für Glykogen gehört. Die beiden Stücke werden nach genügendem Auswaschen in absolutem Alkohol, verschieden behandelt.

Ein Stück wird aus dem absoluten Alkohol unmittelbar in Jod-Jodkalzium (Kalium)lösung gebracht, nachher in Natriumthiosulfatlösung differenziert und in Glyzerin aufbewahrt. Das andere Stück kommt durch eine absteigende Alkoholreihe in destilliertes Wasser, wo es ca. 1 Std. verweilt. Alsdann kommt es in Jod- CaJ_2 , bzw. KJ-Lösung und wird nachher auch in Natriumthiosulfat differenziert. Im ersten Falle sind die Trichinellen fast ausnahmslos tiefbraun tingiert, im zweiten Falle schwindet allmählich die Jodtingierung der Trichinellen, parallel mit der Bleichung des Muskelgewebes.

Man darf vermuten, daß folgendes geschehen ist: im ersten Falle speicherte das in Carnoyscher Flüssigkeit fixierte Glykogen der abgetöteten Trichinellen das Jod aus der Jod-Jodkalzium (Kalium)lösung und hielt es fest; im zweiten Falle verloren die in Carnoyscher Lösung abgetöteten Trichi-

nellen ihren Glykogengehalt, sobald sie in destilliertes Wasser gebracht worden sind.

Es soll erinnert werden, daß in Fleischproben, welche in Carnoyscher Flüssigkeit fixiert und danach mit Jodlösungen behandelt wurden, sowohl die Muskelfasern als auch die Trichinen diffus mit Jod tingiert sind. Dies gilt nicht nur für die mit absolutem Alkohol behandelten Quetschstücke, sondern auch für die in destilliertes Wasser gebrachten Fleischproben. Die Trichinen, welche in den letzt genannten Fleischproben sich befinden, unterliegen trotz intensiver Jodtingierung sehr leicht der Entfärbung im Gegensatz zu dem oben beschriebenen Verhalten der in lebendem Zustande mit Jodlösung behandelten und demzufolge abgetöteten Muskeltrichinen. So liegt die Annahme nahe, daß parallel mit dem Glykogenschwund, Änderungen in der Permeabilität der Cuticula — gewiß nicht nur für Natriumthiosulfat — auftreten, und das Eindringen der chemischen Agentien in den Wurmkörper beträchtlich erleichtern.

Wäre die Jodtinktion von irgendwelchen Fettkomponenten des Trichinenkörpers abhängig, so wäre das negative Resultat der Jodtingierung nach einer völligen Entfärbung in Natriumthiosulfatlösung nur schwer erklärlich.

III.

Nach diesen Erläuterungen sollen noch zwei Punkte besprochen werden: 1) die Wahl der Konzentration der Natriumthiosulfatlösung und 2) die Behandlung des trichinösen Materials vor der Jodtingierung.

Aus leicht verständlichen Gründen ist es unmöglich, solche Natriumthiosulfatlösung vorzubereiten, die bei voller Wirksamkeit keine Gefahr einer Ueberdifferenzierung der Schnitte darbieten würde. Da eine Ueberdifferenzierung des Materials eine Untauglichkeit sowohl für die Jodtingierung als auch für Bestsche Glykogenfärbung bedingt, so muß man empirisch so vorgehen, daß die Möglichkeit eines Nichtgelingens eingeschränkt wird.

Es wurden zwei Verfahren geprüft. Die jodierten Stücke bzw. Schnitte wurden entsprechend lange mit einer schwachen, 0,5proz. und kürzer mit einer stärkeren 5proz. Natriumthiosulfatlösung differenziert. Im ersten Falle, trotz eines „schonenden Verfahrens“, fielen die Resultate ungünstig aus. Die Ausdifferenzierung war regelmäßig kontrastarm, die Trichinen erscheinen blaßgelb, öfter an vielen Stellen partiell oder sogar vollständig entfärbt. Es stellte sich heraus, daß in diesem Falle nicht die Konzentration des Natriumthiosulfats, sondern der Zeitfaktor von ausschlaggebender Bedeutung war. Eine 5proz. Natriumthiosulfatlösung differenziert zwar sehr schnell, aber es erschien öfters unmöglich, den Entfärbungsprozeß so schnell abbrechen zu können, daß die Jodtinktion der Trichinen vollständig geschont blieb. Vielmehr bewirkt eine so starke Lösung stellenweise Entfärbung des Trichinenkörpers und läßt sich deshalb nicht gut verwenden. Es erwies sich 2,5proz. Natriumthiosulfatlösung als die beste und für unsern Zweck am meisten geeignet.

Die Sache ist nicht leicht und in ihren Einzelheiten völlig erklärbar. Offenbar liegen hier ganz andere Permeabilitätsverhältnisse wie bei den abgetöteten und mit Wasserlösungen behandelten Trichinen, welche nachher einer Jodierung unterliegen. Wird jedoch einmal der Widerstand der Trichinencuticula gegen das Eindringen des Natriumthiosulfats gebrochen, so konstatiert man, daß, obwohl die glykogenhaltigen Trichinen ziemlich stark das freie Jod fixieren, die Affinität des Natriumthiosulfats gegen das freie Jod jedoch sich als viel

stärker erwies, und daß sogar die glykogenreichsten Würmer in Natriumthiosulfatlösung früher oder später das aufgespeicherte Jod unbedingt verlieren.

Da im Entfärbungsprozesse der Zeitfaktor sich als der ausschlaggebende erwies, so darf angenommen werden, daß das Natriumthiosulfat ziemlich schwer durch die Kapsel bzw. durch die Oberflächencuticula des Wurmes durchdringt, und daß, ehe Natriumthiosulfat in die Trichinelle eindringt, die Entfärbung des Muskelgewebes vollendet ist.

Was die Vorbehandlung des trichinösen Muskelgewebes vor der Jodtinktion betrifft, so soll noch folgendes bemerkt werden:

a) die Einwirkung einer hohen Temperatur, welche die Trichinellen abtötet, bewirkt völliges Versagen der angegebenen spezifischen Jodtinktion. — b) Alle wässerigen Fixierungsflüssigkeiten, welche die Glykolyse im allgemeinen nicht verhindern und die Trichinellen abtöten, bewirken dasselbe. — c) Die üblichen Fixierungsmittel, insbesondere 5proz. bis 10proz. Formalin, töten die eingekapselten Trichinen binnen 12std. Fixierungsdauer nicht ab und sind deshalb dort empfehlenswert, wo es sich um eine gute Fixierung spezifisch veränderten Muskelgewebes handelt. — d) Bekommt man lebensfrisches Material, bei dem man die Jodtinktion anwenden will, so ist es vorteilhaft, eine kurze Zeit abzuwarten, um das Verschwinden der letzten Glykogenspuren aus dem Muskelgewebe zu erreichen, da sonst die nachherige Jodierung eine Muskelglykogenfärbung bewirken und dadurch manche Schwierigkeiten bei dem Entfärbungsprozeß verursachen kann. Es ist sogar vorteilhaft, das frische Gewebe in destilliertes warmes Wasser einzulegen. Das Gewebe quillt unbedeutend und schadenlos auf, ist dagegen sicher von jeder Spur des Glykogens befreit. — e) Will man Quetschpräparate und keine Gefrierschnitte anfertigen, so soll das Material sowohl vor dem Fixieren als auch vor der Jodeinwirkung komprimiert werden. Erst komprimierte und genügend dünne Stücke des Muskelgewebes können weiter behandelt werden. Die Jodeinwirkung verändert in hohem Grade die physikalischen Eigenschaften des Muskelgewebes, welches sich in dünne Scheiben nicht mehr komprimieren läßt. — f) Will man Gefrierschnitte anfertigen, so ist daran zu denken, daß sogar fixiertes Material in der Regel lebende Trichinen beherbergt, und daß die niedrige Temperatur des Gefriermikrotomes für sie unschädlich ist. Deswegen ist es angezeigt, sowohl ganz frisches als auch fixiertes trichinöses Gewebe, welches zum Schneiden bestimmt ist, mit der angegebenen Jodlösung zu behandeln. Fleischproben, welche genügende Zeit in Jodlösungen verweilen, sind ohne besondere Vorsicht zum Mikrotomieren und zur weiteren Behandlung geeignet, da alle Trichinellen ausnahmslos tot sind. — g) Die der Jodierung vorausgehende Fixierung ist am zweckmäßigsten in 5proz. Formol vorzunehmen. Die Carnoysche Flüssigkeit ist aus mehreren Gründen viel weniger zweckmäßig.

Am schnellsten kommt man zum Ziel, wenn entsprechendes Material ohne weiteres mit Jodlösung behandelt wird.

Was die Haltbarkeit der spezifischen Jodtinktion betrifft, so soll hervorgehoben werden, daß sie keine große ist. Schöne und kräftige Ausfärbung bleibt bei gut gelungenen Präparaten etwa eine Woche lang bestehen; nachher beginnen die Trichinellen stufenweise abzublassen, obwohl sich die gelbliche Tinktion noch sehr lange Zeit gut erkennen läßt.

Das Auswaschen sowohl mit Salzsäure, als auch Essigsäurelösungen, bringt keinen merklichen Nutzen, obwohl in diesem Falle öfters beobachtet werden kann, daß aus den Natriumthiosulfatspuren, die noch im Präparate stecken, ein Niederschlag ausgefällt wird. Die Ansäuerung ist um so weniger zu

empfehlen, als sie die darauffolgende Hämatoxylin- bzw. Hämalaunfärbung hindert.

Werden die fertigen Präparate in Glycerin aufgehellt, so sollen sie sofort eingeschlossen und luftdicht umrandet werden. Eingeschlossene und nicht luftdicht umrandete Präparate verlieren in wenigen Tagen fast vollständig ihre Tingierung.

Die angegebene Tinktionsmethode ist Nebenresultat der Beobachtung über Jodaufspeicherung und Jodbindung durch die Muskeltrichinellen. Sie dürfte sich für Demonstrations- und Untersuchungszwecke in die Trichinellenforschung einführen, umsomehr, als sie einfach und ihre Anwendung schnell und sicher ist.

Zusammenfassung.

Es wird nachgewiesen, daß die Muskeltrichinellen die Fähigkeit der Jodaufspeicherung und Jodbindung besitzen. Die Jodaufspeicherung wird vor allem dem Glykogengehalt des Trichinellenkörpers und die relativ feste Jodbindung einer erschwerten Permeabilität für das Natriumthiosulfat durch die Cutikula zugeschrieben. — Gleichzeitig wurde festgestellt, daß die mit Jodlösung tingierten Trichinellen nach darauffolgender völliger Entfärbung mit Natriumthiosulfat ihre relativ feste Jodbindung vollständig verlieren. — Dies steht in einem engen Zusammenhange mit der Fettstoffarmut der Trichinellen, die durch negative Resultate der Bemühungen, die Fettstoffsubstanzen elektiv zu färben, nachgewiesen wird. — So wurde die Anschauung, daß die jodophile Substanz der Muskeltrichinellen hauptsächlich in Glykogen zu suchen ist, mittelbar bestätigt. — Die relativ geringe Haltbarkeit der Jodtinktion wird an erster Stelle einer Fettarmut des Muskeltrichinellenkörpers zugeschrieben.

Es sei mir gestattet, auch an dieser Stelle meinem hochverehrten Lehrer und Chef, Herrn Prof. Dr. W. Szymonowicz, für sein bereitwilliges und freundliches Entgegenkommen bei der Ausführung dieser Arbeit und für sein reges Interesse für die Arbeitsergebnisse, meinen herzlichsten und verbindlichsten Dank auszusprechen.

Ausführung der angegebenen Jodtinktionsmethode.

- 1) Einlegen der bis 1 ccm großen Fleischproben auf 1—12 Std. in Jod-Jodkalzium(Kalium)-lösungen von folgender Zusammensetzung: Jodi p. cryst. 1 g, Calcii (Kali) jodati 2 g, Aq. dest. 100 ccm.
- 2) Kurzes Abwaschen in dest. Wasser.
- 3) Herstellen der ca. 200 μ dicken Gefrierschnitte. Die Muskelfasern sollen in der Richtung der Messerbewegung liegen.
- 4) Differenzieren in 2,5proz. Natriumthiosulfatlösung bis zur Entfärbung der Muskelfasern.
- 5) Auswaschen 5 Minuten in mehrmals erneuertem dest. Wasser.
- 6) Färben in ziemlich starken Delafieldschsen Hämatoxylin- oder Mayers Hämalaunlösung 10—20 Minuten.
- 7) Auswaschen 5—10 Minuten in Leitungswasser.
- 8) Dest. Wasser 1 Minute.
- 9) Glycerin bis zu völliger Aufhellung.
- 10) In Glycerin einschließen und sofort luftdicht umranden.

Erklärung der Tafelabbildungen.

Fig. 1. Gefrierschnitt von ca. 200 μ Dicke aus dem mit Jod-Jodkalziumlösung behandelten *Musc. masseter* eines Kaninchens 42 Tage nach der Fütterung. Differenzierung in 25proz. Natriumthiosulfatlösung. Glycerinpräparat. Man sieht eingerollte, enkapsulierte Trichinellen, welche stark mit Jod tingiert sind. Das Muskelgewebe ist ungefärbt und läßt keine deutliche Struktur erkennen. — Obj. Reichert 5, Zeichenskular Leitz IV. Tubuslänge 160 mm.

Fig. 2. Dasselbe Material. Differenzierung wie oben. Nachfärbung in Mayers Hämalaunlösung. Glycerinpräparat. Man sieht eine mit Jod elektiv ausgefärbte Trichinelle, deutliche Querstreifung der Muskelfasern. Trichinellenkapsel (a) mit einem Raum (b), welches durch Schrumpfung des Trichinellenkörpers entstanden ist. — Obj. Zeiß DD, Zeichenokular Leitz II Tubuslänge 160 mm.

Inhalt.

v. Daranyi, J., Beitrag zur Konservierung von Bakterienkulturen mit Paraffin. Mit 1 Abbildung im Text, S. 160.

David, Hans, Ueber das Vorkommen von Wutvirus im Gehirn schutzgeimpfter gesunder Tiere. I. Mitteilung, S. 49.

Dubrowinski, S. B., Kranzfeld, A. M., Rosenfeld, W. D., u. Salamandra, E. G., Zur Hakenwurmverbreitung in Turkmenistan. Mit 1 Abbildung im Text, S. 172.

Fortner, Joseph, Ein einfaches Plattenverfahren zur Züchtung strenger Anaërobier (anaërobe Bazillen — filtrierbare anaërobe Bakterien — *Spirochaeta pallida*). Mit 6 Abbildungen im Text, S. 155.

Gerbasi, M., u. Giuffrè, M., Beitrag zur Kenntnis des Poliomyelitis-, Encephalitis- und Herpesvirus, S. 58.

Gurvitsch, B. M., Zur Differenzierung virulenter und avirulenter Rotzkulturen mittels des Phänomens der Methylenblauerduktion, S. 177.

Hobmaier, A., und M., Morphologie und Biologie der Larve von *Gastrophilus pecorum*. Mit 1 Tafel, S. 163.

Hoffenreich, F., Kapselsubstanz aus *Bacillus avisepticus*, S. 87.

Jelin, W., u. Feldmann, F. (†), Ueber das Schicksal des *Timotheebazillus* im tierischen Organismus und über durch diesen Bazillus hervorgerufene pathologisch-histologische Veränderungen. I., S. 41.

Kalwaryjski, Bernard, Eug., Ueber Jodaufspeicherung und Jodbindung durch

die Muskeltrichinellen. Mit 1 Tafel, S. 186.

Kapeller, Ueber den mikroskopischen Tuberkelbazillennachweis, S. 7.

Kostylew, N. N., Acanthocephalen der Fische des Goktscha-Sees. Mit 7 Abbildungen im Text, S. 146.

Kristensen, Martin, Untersuchungen über die Rolle des Bangschen Abortbazillus als menschenpathogenen Mikroben, S. 89.

Lange, B., u. Lydtin, K., Ein Verfahren der Virulenzbestimmung von Tuberkelbazillen für die Laboratoriumspraxis, S. 22.

Lieske, Rudolf, Untersuchungen über die Krebskrankheiten bei Pflanzen, Tieren und Menschen. Mit 3 Tafeln, S. 118.

Perekropoff, G. J., Zur Morphologie der Parasiten der chronischen Malaria. Mit 1 Tafel, S. 26.

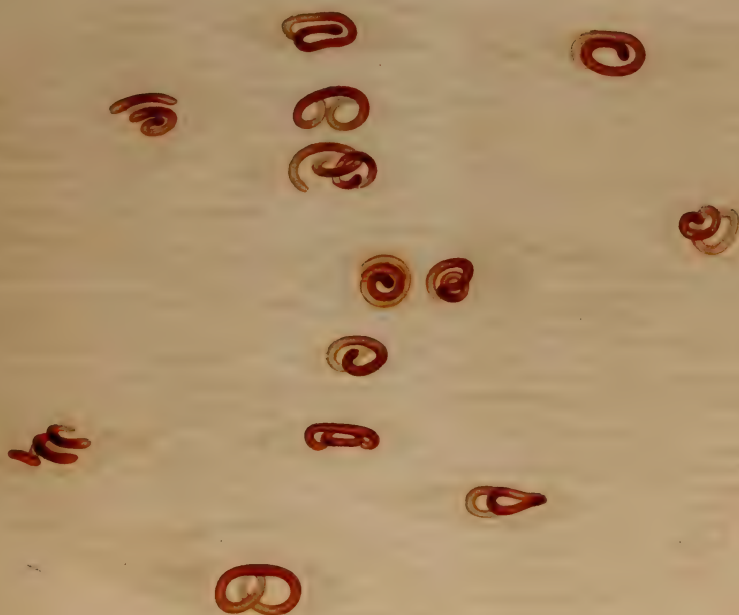
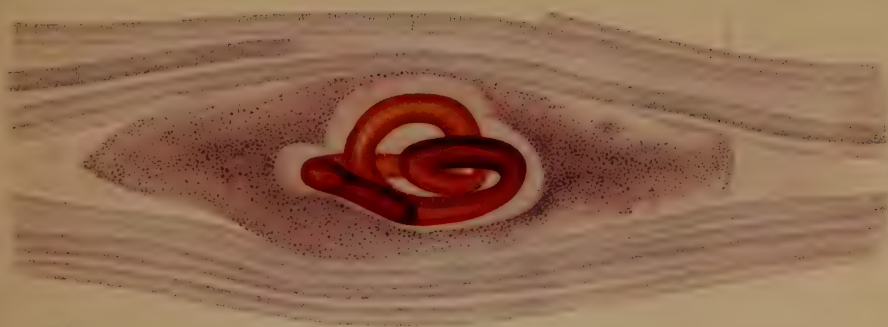
Proell, Fr., u. Stickl, O., Streptokokkenbefunde bei Zahnerkrankungen in Beziehung zur Lehre von der oralen Sepsis, S. 12.

Riedmüller, L., Ueber die Morphologie, Uebertragungsversuche und klinische Bedeutung der beim sporadischen Abortus des Rindes vorkommenden Trichomonaden. Mit 4 Abbildungen im Text, S. 103.

Schiller, Ignaz, Zur Frage der Züchtung der Tuberkelbazillen im negativen Auswurf, S. 1.

Schubert, Johann, Fettsäuren und Mycoides-Lysin, S. 151.

van den Hoven, van Genderen, Jeanne, u. Dik, J. H., Zur Frage des Vorkommens von *Virus fixe* im Gehirn bei der Antirabiesbehandlung, S. 52.



Ausgegeben am 21. August 1928.

Nachdruck verboten.

Das Ektoplasma der Hefezelle.

Untersuchungen über die chemische Zusammensetzung der Zellmembran und der Kittsubstanz der Hefezelle¹⁾.

Von **Josef Schumacher**, Berlin.

Mit 1 Abbildung im Text.

Exakte Untersuchungen über den chemischen Aufbau des Ektoplasmas der Hefezelle liegen bis jetzt nicht vor. Zwar glaubt Gutstein²⁾ den Nachweis geführt zu haben, daß das Ektoplasma der Hefe ein Lipoid enthalte und dies wahrscheinlich Lezithin sei; indessen sind seine Beweise nicht stichhaltig, und zwar aus folgenden Gründen. Einmal hat er übersehen, seine zu den oben erwähnten Untersuchungen herangezogene Hefe von ihren freien Lipoiden zu befreien. Aus diesen besteht daher größtenteils sein durch Alkoholextraktion erhaltenes Lipoidgemisch, in dem er glaubt, das Ektoplasmalipoid vor sich zu haben. Weiterhin verwendet er hierzu (l. c. S. 10) Hefe, die nur nukleinsäurefrei gemacht worden war, weshalb in seinem Extrakt auch noch die vorher an Eiweiß gebundene Lipidsäure des Endoplasmas der Hefe sich befindet. Außerdem befindet sich in seinem analysierten Gemisch das Lipoid des Ektoplasmas, nämlich dasjenige der Kittsubstanz, überhaupt nicht, da es nur in heißem Alkohol löslich ist, wie aus den folgenden Untersuchungen eindeutig hervorgehen dürfte. Gutstein aber kalten Alkohol zur Extraktion benutzte. Aus denselben Gründen, wie soeben angegeben, kommt auch neueren Angaben³⁾ keinerlei Beweiskraft zu, nach denen das Ektoplasmalipoid nach einer Analyse von Magistris ein Diaminomono-phosphatid sein soll, das an ein Kohlehydrat und eine Anthozyanin-gruppe gebunden sein soll. Das Ergebnis der Analyse von Magistris soll in keiner Weise angezweifelt werden, indessen ist auch hierbei Hefe verwendet worden, die vorher nicht von ihren freien Lipoiden befreit und der auch die Lipidsäure des Endoplasmas nicht entzogen worden war. Es hätte aber nur eine Analyse der isolierten Zellmembranen zu dem gewünschten Resultat geführt.

An einer anderen Stelle (l. c. S. 10) glaubt Gutstein aus seinen Versuchen schließen zu dürfen, daß das Ektoplasma der Hefezellen kein Kohlehydrat enthalte. Die nachstehenden Befunde dürften den Nachweis erbringen, daß das Ektoplasma der Hefe geradezu ein Kohlehydratdepot darstellt. In seinen diesbezüglichen Versuchen hat Gutstein das Resultat der Trommerschen Probe übersehen.

Weitere Einzelheiten über den Bau des Ektoplasmas finden sich bereits an anderer Stelle⁴⁾, auf die hiermit verwiesen sei.

I. Die färberische Darstellung der einzelnen äußeren Hefezellschichten.

In einwandfreier Weise gelingt diese Darstellung mit 2 Methoden:

1) an der lebenden Hefezelle durch Vitalfärbung mit der Viktoria-blaubase,

2) an der vorher abgetöteten Zelle durch eine Gram-Färbung in vitro.

Im ersteren Fall verfährt man nach der bereits andernorts⁵⁾ geschilderten Technik. Im zweiten Fall tötet man die Hefe in wässriger Suspension zunächst durch Einstellen in ein kochendes Wasserbad ab. Nunmehr wäscht man einen

1) Zugleich XV. Mitt. „Zur Chemie der Zellfärbung.“

2) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 95. S. 18.

3) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 85.

4) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 107. S. 175 ff.

5) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 98. S. 75 ff.

Teil dieser Hefe in der Zentrifuge mit dest. Wasser mehrmals, färbt sie im Zentrifugenglas mit Anilin-Gentianaviolett, wäscht den Farbstoff unter Zentrifugieren mit dest. Wasser aus, behandelt mit Lugolscher Lösung, die man ebenfalls nach einer Einwirkungszeit von ca. $\frac{1}{2}$ Std. mit dest. Wasser entfernt, worauf man alsdann mit absolutem Alkohol so lange nachbehandelt, bis dieser nur mehr schwach violett gefärbt ist. (Betrachtung im hängenden Tropfen).

In beiden Fällen erkennt man an der Hefezelle einwandfrei nur 3 Schichten; im Falle der Vitalfärbung mit der Viktoriablaubase:

1) Das blau gefärbte, lipoidhaltige Endoplasma, dessen Lipoidgehalt histochemisch durch seine Blaufärbung mit der rotbraunen Viktoriablaubase bewiesen wird, die ihrer Wasserunlöslichkeit wegen nur mit den Lipoiden in chemische Reaktion zu treten vermag. Makrochemisch wird der Lipoidgehalt des Endoplasmas bewiesen durch Isolierung der Lipoide in großem¹⁾.

2) Die farblose, einen Fehlingsche Lösung reduzierenden Komplex enthaltende Hefezellmembran, was in dieser Arbeit bewiesen werden soll.

3) Die blau gefärbte, lipoidhaltige Kittsubstanz der Hefezelle, aus Phosphatiden bestehend, was ebenfalls in dieser Arbeit bewiesen werden soll (s. farbige Reproduktion dieser 3 Schichten, Centralbl. f. Bakt. I. Orig. Bd. 98. Tf. Ia und II. Fig. 1. S. 80).

Im Falle der Gram-Färbung in vitro erkennt man die lipoidfreie Zellmembran umgeben von dem schwarzviolett gefärbten Endoplasma und der ebenso tingierten Kittsubstanz.

Die Frage, ob an der Grenze zwischen Endoplasma und Zellmembran noch eine besondere Innenmembran²⁾ vorhanden ist, ist bereits in negativem Sinne entschieden worden³⁾.

a) Die Hefezellmembran.

Ihre Darstellung gelingt leicht, wie erwähnt und bereits oben ausführlich beschrieben, am lebendem Objekt bei einer Vitalfärbung mit der Viktoriablaubase als auch bei einer Gram-Färbung der Hefe in vitro, wo sie in beiden Fällen ungefärbt bleibt, aber deutlich zu erkennen ist, da sie innen von dem blauen oder violetten Endoplasma, außen von der ebenso gefärbten Kittsubstanz umgeben wird. (Ueber ihre Darstellung in vitro mit Silbernitrat

1) S. hierüber „Zur Gramschen Färbung“. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. 1928.

2) Hierüber s. „Das Ektoplasma der Bakterien“. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 107. S. 176.

3) Zu der Vitalfärbung lebender Zellen mit der Viktoriablaubase glaubt Gutstein neuerdings kritisch Stellung nehmen zu müssen (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 104.) Er ist der Ansicht, daß das Fehlen der „inneren Ektoplasmamembran“ in meinen Versuchen durch eine Ueberfärbung vorgetäuscht sei. Die oben bereits zit. Bilder zeigen aber gerade das Gegenteil. Von einer „Ueberfärbung“ kann bei der Färbung mit der Viktoriablaubase keine Rede sein, da die Base sich nur ungefähr im Verhältnis von 1:1000000 in Wasser löst. Solch verdünnte Farblösungen, bisher kaum gebraucht, erzeugen erfahrungsgemäß keine Ueberfärbung. Auf die Unbrauchbarkeit der Nilblaubase zur Vitalfärbung habe ich schon des öfteren hingewiesen. Gerade der Umstand, daß sich die Viktoriablaubase jahrelang hält, macht sie zu dieser Art von Färbungen sehr brauchbar. Selbstverständlich muß sie in verschlossenen Gefäßen aufbewahrt werden, da sonst die Kohlensäure und das Wasser der Luft sie langsam in das blaue Salz überführen, was bei der Nilblaubase fast sofort geschieht. Nach Gutsteins Meinung soll die Färbung bei Gebrauch der Viktoriablaubase mit dem Farbsalz erfolgen, „nachdem Chloride und andere Anionen aus den Zellen in das durchaus nicht indifferente Suspensionsmedium (Aq. dest.) ausgetreten seien. Ueberflüssig zu erwidern, daß Chloride aus der Base kein Farbsalz zu bilden vermögen, sondern hierzu bekanntlich nur Säuren befähigt sind. Außerdem würde dann auch das Suspensionsmedium blau werden und nicht farblos bleiben, wenn die Ansicht Gutsteins der Wirklichkeit entsprechen würde. Aus diesen beiden Gründen sind die gemachten Einwände in keiner Weise stichhaltig.

(s. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 93. S. 238). Auch hierbei unterliegt man leicht einer Täuschung, indem man eine doppelt konturierte Membran zu erblicken glaubt, weil sich der braune Hefezellinhalt von der hellgelben Zellmembran stark abhebt, deswegen, weil wir ja oben nachweisen konnten, daß eine besondere Begrenzung des Endoplasmas gegenüber der Zellmembran nicht existiert.

An der toten Zelle gelingt die Darstellung der Zellmembran im eigentlichen Sinne mit der Safranin-Tannin-Methylenblaumethode Gutsteins. Die keine sauren Substanzen enthaltende Zellmembran färbt sich deswegen nicht mit basischen Farbstoffen ohne weiteres, geht aber hier mit ihrem basischen Eiweiß mit dem sauren Tannin eine Verbindung ein, bildet gerbsaures Eiweiß, das dann sekundär gerbsaures Methylenblau bildet, weshalb die Membran alsdann blau erscheint. Ein viel einwandfreieres Bild erhalten wir aber, wenn wir hierzu nukleinsäure- und gramfreie Hefezellen nehmen und das Endoplasma¹⁾ mit Erythrosin und dann mit Tannin-Methylenblau nachfärben.

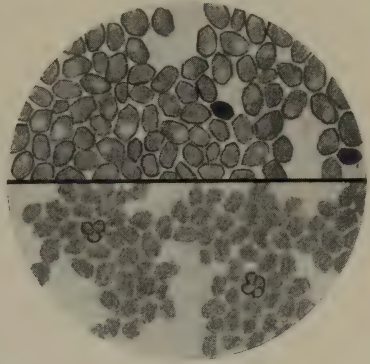


Fig. 1.

Technik: Käufliche Hefe wird im Verhältnis 1:10 mit 1:4 verdünnter Salzsäure 1 Std. lang im Schüttelapparat geschüttelt und nach Abzentrifugieren und 4maligem Auswaschen in der Zentrifuge mit dest. Wasser wieder im Verhältnis 1:10 mit 25proz. HCl-Alkohol (HCl 25 ccm 96proz. Alkohol ad 100) 6 Std. lang geschüttelt. Nach mehrmaligem Auswaschen mit kaltem 96proz. Alkohol erkennt man an nach Gram gefärbten Ausstrichen, daß die Hefe jetzt gramnegativ geworden ist, wie das bereits 1924 von mir beschrieben wurde²⁾. Zur Vornahme dieser Färbung müssen die mit Alkohol gewaschenen Hefezellen erst mit der Hälfte dest. Wasser angerührt werden und dann auf Objektträger ausgestrichen werden, andernfalls die Ausstriche nicht haften bei der Hitzefixation.

1) Membranfärbung mit Erythrosin-Tannin-Methylenblau.

Die so gewonnenen Ausstriche werden 2 Min. lang mit 1proz. Erythrosinlösung gefärbt, abgespült, 2 Min. mit 5proz. Tannin behandelt und nach Abspülen mit Methylenblau nachgefärbt. Zelleib erythrosinrot, Membran blau (Fig. 1. ob. Hälfte).

2) Differente Membranfärbung der Hefezelle und der Hefesporenmembran.

Bei einem so differenten chemischen Aufbau, wie ihn die Zellmembran der vegetativen Hefe besitzt (Phosphorglukoproteid) und demjenigen ihrer Sporen, wo ein Lipoproteid vorliegt, war anzunehmen, daß auch das am Aufbau beider Substanzen sich beteiligende basische Eiweiß nicht identisch war, mithin die Möglichkeit bestand, es färberisch different zur Darstellung zu bringen.

Wir nehmen als Ausgangsmaterial die nach der obigen Technik gewonnene nukleinsäure- und gramfreie Hefe, wobei wir aber solche Hefe zur Hydrolyse verwenden, bei der wir uns vorher davon überzeugt haben, daß sie einige Sporen

1) Das nach der Nukleinsäureentfernung durch Säurevorbehandlung intensiv die sauren Farben annimmt, wie früher schon betont. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 73. S. 338) u. „Chemie d. Zelle u. Gewebe“. Bd 13. S. 191 ff.

2) Ebenda, Orig. Bd. 93. S. 266. S. auch Mitt. VI. „Zur Chemie der Zellfärbung“. Dermat. Wochenschr. Bd. 86. S. 593.

enthält. Wir färben diese Ausstriche einfach einige Minuten lang mit der Unnaschen Bepi-Lösung¹⁾. Die Sporenmembran nimmt dabei die saure blaue Farbe auf, wodurch die roten Sporen von einem blauen Ring umgeben werden, während die vegetativen Hefezellen samt ihrer Membran rein rot erscheinen, wenn sich auch hier die Membran der gleichen roten Farbe des Zellinhaltes wegen nicht abhebt (Fig. 1. u. Hälfte). Wir konnten ja aber ihre Anwesenheit vorher dadurch nachweisen, daß wir die Zellen mit Erythrosin vorfärbten, mit Tannin beizten und mit Methylenblau nachfärbten (Fig. 1. ob. Hälfte).

b) Die Kittsubstanz der Hefezelle.

Wie bereits betont, nur am lebenden Objekt mit der Viktoriablaubase darstellbar oder violett bei der Färbung durch Hitze oder durch Alkohol abgetöteter Hefe nach Gram *in vitro*.

Experimenteller Teil.

Bevor man zur Untersuchung der chemischen Zusammensetzung der Zellmembran und der Kittsubstanz der Hefe schreiten konnte, mußte die Materialfrage gelöst werden. Gewinnt man, nämlich die Zellmembranen nach dem bis jetzt üblichen Verfahren der Autolyse, so sind sie niemals ganz frei von Hefeeiweiß zu bekommen, was man schon durch die Zellfärbung erkennen kann. Das sieht man weiterhin daran, daß auch die so erhaltenen und gewaschenen Zellmembranen stets noch hefegelb aussehen, während die reinen, von Hefeeiweiß befreiten Zellmembranen eine schneeweiße Farbe haben. Wir beschreiten daher zur Materialgewinnung zunächst einen anderen Weg, verhehlen uns aber keineswegs, daß die hieraus gezogenen Schlußfolgerungen zunächst nur bedingt zulässig sind.

Material: 50 g Hefe wurden unter langsamer Zugabe der 5fachen Gewichtsmenge von analysenreinem, gepulvertem Kalziumkarbonat ordentlich in der Reibschale geknetet, bis die Masse durch Ausfließen des Zellinhaltes teigig, am Schluß durch weitere Zugabe von Kalziumkarbonat fast trocken geworden war. Je weiter und intensiver man die Durchknetung betreibt, um so weniger Zellen erhält man im Rückstand, die der mechanischen Zerstörung entgangen sind. Darauf wurde das Ganze mit 300 ccm dest. Wasser zu einem gleichmäßigen Brei angerührt und $\frac{1}{2}$ Std. lang im Schüttelapparat geschüttelt zur Extraktion des aus der Zelle ausgetretenen Zellinhaltes, wodurch man eine weißliche opaleszierende, den ursprünglichen Zellinhalt der Hefe enthaltende Flüssigkeit erhält. Von dieser wurde durch Zentrifugieren getrennt. Zur gründlichen Entfernung des Zellinhaltes wurden die so erhaltenen Zellmembranen nochmals 10mal in der Zentrifuge mit dest. Wasser gewaschen.

Nach unseren früheren Ausführungen enthalten die so gewonnenen Zellmembranen außerdem noch die Kittsubstanz, während der Zellinhalt aus 90—95 Proz. der Zellen verschwunden ist. Streicht man die so erhaltene Masse auf Objektträger aus und stellt diese vor Vornahme der betreffenden Färbung kurze Zeit in verdünnte Essigsäure zur Auflösung des noch vorhandenen Kalziumkarbonates, so bleiben die reinen Zellmembranen auf dem Objektträger zurück. Eine Färbung nach Gram zeigt alsdann, daß nur noch wenig intakte, daher noch grampositive Zellen vorhanden sind. An der ganz schwach violetten Färbung der Zelltrümmer, die nur mikroskopisch zu erkennen ist, (makroskopisch ist das Präparat ungefärbt) erkennt man, daß die schwach grampositive Kittsubstanz noch zugegen ist, weshalb auch wässrige Viktoriablaulösung noch schwach blau färbt. Wir wollen uns erinnern, daß die Kittsubstanz aus einem Lipoid besteht, wie wir oben sahen, da sie sich sowohl lebend mit der Viktoriablaubase blau färbte, als auch noch violett bei der Gramschen Färbung

1) Dieselbe enthält das rote Phloxin, Pikrinsäure und Wasserblau.

der Hefezelle *in vitro*. Eine Tannin-Safraninfärbung eines anderen Ausstriches, die außerordentlich stark positiv ausfällt, zeigt uns weiter, daß die Zellmembranen noch sämtlich zugegen sind.

Auf Grund dieser histochemischen Untersuchungen sehen wir, da die Zellmembranen das saure Tannin annehmen und wir hinterher das entstandene gerbsaure Eiweiß mit Safranin zu färben vermögen, daß in der Zellmembran ein basisches Eiweiß vorhanden ist, welche Schlüsse auch Gutstein bereits zieht. Eine Färbung mit der Viktoriablaubase zeigt uns andererseits die Anwesenheit geringer Lipoidreste, die der Kittsubstanz entsprechen, da wir ja gerade früher sahen, daß die Zellmembranen sich hierbei in keiner Weise färben. Wir haben diese histochemisch erhobenen Befunde nun auch makrochemisch zu beweisen.

Extrahieren wir die oben gewonnenen Hefezellmembranen des Kalziumkarbonatgemisches über Nacht mit kaltem Alkohol, so läuft dieser nach dem Filtrieren absolut farblos ab und hinterläßt beim Eindampfen nur geringe Mengen eines gelblich weißen Rückstandes. Da aber auch dann noch die Zelltrümmer sich mit der Viktoriablaubase färben lassen, so müssen sie noch weitere Lipide enthalten, die wahrscheinlich in Alkohol nicht besonders löslich sein dürften. Auch durch eine Aetherbehandlung wird das Resultat nicht wesentlich anders.

Enthält die Kittsubstanz aber dennoch größere Mengen eines freien Lipoids? Das ist die nächste Frage. Zu diesem Zweck kochen wir jetzt das Hefezellmembran-Kalziumkarbonatgemisch mit Alkohol aus und filtrieren durch einen Heißwassertrichter. Der absolut farblos und klar abfließende Alkohol läßt aber beim Erkalten ein feines, weißes Sediment fallen.

Analyse des Sedimentes. Der das aufgeschüttelte Sediment enthaltende Alkohol wird jetzt mit der gleichen Menge dest. Wasser bis zur eintretenden Opaleszenz versetzt und alsdann konz. Salzsäure zugegeben, so daß auf 100 ccm Flüssigkeit 10 ccm konz. 37proz. Salzsäure kommen. Alsdann wurde das Ganze hydrolysiert, bis die Flüssigkeit auf ca. den fünften Teil eingedampft war, wobei sie sich rasch gelb, zuletzt braun färbt infolge hydrolytischer Abspaltung einer Fettsäure, die der Hydrolysenflüssigkeit durch Aufschütteln mit Aether entzogen werden kann und die als braungelbe, fettige Masse nach Verdunsten des Aethers zurückbleibt. Sie ist gramnegativ und färbt sich stark mit der Viktoriablaubase. Ihre alkoholische Lösung entfärbt mit Soda schwach rosa gefärbte Phenolphthaleinlösung. Fehlingsche Lösung wird durch die Hydrolysenflüssigkeit nach Alkalisierung nicht reduziert.

Ein anderer Teil der alkoholischen, das aufgeschüttelte vorher ausgefallene Sediment enthaltenden Flüssigkeit wird auf dem Wasserbad eingedampft, in der üblichen Weise verascht und mit Ammoniummolybdat auf die Gegenwart von Phosphorsäure geprüft. Phosphorsäure: positiv. Mit einem weiteren Teil wird die Lasseignesche Probe auf Stickstoff angestellt. Stickstoff: positiv.

Aus dieser Analyse ergibt sich folgendes: Die Kittsubstanz der Hefezelle enthält zur Hauptsache ein nur in heißem Alkohol lösliches Phosphatid. Das Vorliegen eines Zerebrosides kann durch die negative Fehlingsche Probe nach Hydrolyse des Lipoids ausgeschlossen werden. Von den in Betracht kommenden Phosphatiden scheidet von vornherein das Lezithin aus, einmal, weil es auch in kaltem Alkohol sich leicht löst, des weiteren, weil seine alkoholischen Lösungen gelblich aussehen, während wir hier ein Phosphatid vorliegen haben, das sich nur in heißem Alkohol löst und von weißer Farbe ist.

Für die chemische Natur des isolierten Lipoids kommen daher in erster Linie das Kephalin und das Sphingomyelin in Frage, von denen das vor-

liegende Lipoid seinen Eigenschaften nach (aus heißer alkoholischer Lösung weiß auszufallen) aber dem Sphingomyelin am nächsten stehen dürfte. Weiter spricht in diesem Sinne, daß Sphingomyelin mit Wasser unter Emulsionsbildung aufquillt, was gerade für das physiologische Verhalten der Kittsubstanz lipoidunlöslichen Stoffen (Nährbestandteilen) gegenüber von der allergrößten Wichtigkeit ist.

Wir gehen daher wohl nicht fehl, wenn wir annehmen, daß in diesem Lipoid Sphingomyelin oder ein ihm nahe verwandtes, noch unbekanntes Phosphatid vorliegt, dessen sichere Gegenwart erst durch den Nachweis seiner weiteren Spaltprodukte, des Cholins und des Sphingosins erbracht werden kann.

Naturgemäß kann man bei Verwendung dieses Materials, wie eingangs der Arbeit bereits erwähnt, den Einwand erheben, daß das isolierte Lipoid den freien Lipoiden der in dem verarbeiteten Gemisch noch vorhandenen wenigen intakten Hefezellen entstammen könnte. Dem gegenüber aber muß betont werden, daß es erstens sehr unwahrscheinlich ist, daß die relativ größeren Mengen des isolierten Lipoids von den wenigen intakten Zellen herstammen sollten und nicht von der Kittsubstanz, die doch in erster Linie mit den Zellmembranen in dem verarbeiteten Gemisch vorliegt. Außerdem darf vielleicht darauf hingewiesen werden, daß ein alkoholischer Auszug aus intakten Hefezellen schon in der Kälte stets hellgelb aussieht und beim Verdunsten einen braunen Rückstand hinterläßt, während wir hier ein rein weiß aussehendes Phosphatid vor uns haben, was schon gegen den oben gemachten Einwand sprechen dürfte. Unentschieden ist durch diese Versuche natürlich noch die Frage, ob die Kittsubstanz auch an Eiweiß gebundene Lipide enthält. Aber schon die Tatsache, daß die zurückbleibenden Zellmembranen sich auch nach der heißen Alkoholextraktion noch mit der Viktoriablaubase und Viktoriablau färben und auch die schwache Gram-Positivität noch zeigen, beweist, daß noch weitere gebundene Lipide in der Kittsubstanz enthalten sein müssen, worauf wir noch zurückkommen.

Nun wurde das mit heißem Alkohol ausgezogene Zellmembran-Kalziumkarbonatgemisch durch Eintragen in verdünnte Salzsäure vom Kalziumkarbonat befreit. Zentrifugiert man alsdann die Flüssigkeit, so erhält man die Zellmembranen als schneeweiße Masse. Daß die Auflösung des Kalziumkarbonates in verdünnter Salzsäure keine weitgehenden chemischen Veränderungen gesetzt hat, erkennt man wieder bei einer kombinierten Gram-Tannin-Safraninfärbung. Man sieht auch hier wieder, daß nur wenig intakte Hefezellen zugegen sind und erkennt auch noch die schwach grampositive Kittsubstanz, in der aber das vorher nachgewiesene freie Lipoid jetzt naturgemäß fehlt.

Werden die so gewonnenen Hefezellmembranen in Wasser suspendiert und im Verhältnis von 1:10 mit konz. Salzsäure versetzt und $\frac{1}{4}$ Std. lang gekocht, so reduziert jetzt schon die Hydrolysenflüssigkeit nach Alkalisierung außerordentlich stark Fehlingsche Lösung, welche Eigenschaft die in Wasser suspendierten Hefezellmembranen vor der Hydrolyse nicht zeigten.

Auch hier könnte man wieder den Einwand machen, daß die nach der Hydrolyse auftretende positive Fehlingsche Probe darauf beruhen könnte, daß die wenigen intakten Hefezellen ja noch Nukleinsäure enthielten und diese naturgemäß ebenfalls durch die Salzsäurehydrolyse aufgespalten worden sei. Dadurch würde naturgemäß Pentose in Freiheit gesetzt, welche die Fehlingsche Lösung reduzierte. Dieser Einwand ist richtig, aber zu der außerordentlichen hohen Reduktionskraft, die die Hydrolysenflüssigkeit zeigt, steht doch die geringe Menge der noch vorhandenen intakten Hefezellen im Gegensatz. Man kann diesen Einwand aber ohne weiteres widerlegen. Zu diesem

Zweck behandeln wir die vom Kalziumkarbonat befreiten Hefezellmembranen mit 1:4 verdünnter konz. Salzsäure 2½ Std. im Schüttelapparat, in welcher Zeit die Nukleinsäure hydrolytisch aufgespalten wird, aus den Zellen austritt, was wir am Verschwinden der Methylenblaufärbung bereits früher bei so vorgenommener Hydrolyse von Hefezellen erkannten. Darauf wurden die Zellmembranen nach der Entfernung der Nukleinsäure aus den intakten Zellen mehrere Male in der Zentrifuge mit dest. Wasser gewaschen und da möglicherweise in den Lipoproteiden der intakten Zellen Kohlenhydrate zugegen gewesen sein konnten, durch weitere Behandlung der Hefezellmembranen mit Salzsäure-Alkohol (Schütteln der Zellmembranen im Verhältnis 1:10 in HCl 25ccm, Alkohol ad 100) auch die Lipoidsäure entfernt. Kohlehydrate sind übrigens in den Lipoproteiden nicht enthalten, wie das bereits aus einer anderen Arbeit¹⁾ hervorgeht.

Auch nach dieser Behandlung reduzieren die mit Salzsäure gekochten Hefezellmembranen nach wie vor stark Fehlingsche Lösung, so daß wir hieraus mit Sicherheit auf die Gegenwart eines Fehlingsche Lösung reduzierenden Komplexes in der Zellmembran der Hefe schließen dürfen, da wir auch in den Lipoiden der Kittsubstanz, wie später noch in dieser Arbeit gezeigt werden soll, keinerlei Kohlehydrate nach der Hydrolyse nachzuweisen vermochten, die außerordentlich starke Reduktionsfähigkeit, welche die hydrolysierten Zellmembranen zeigen auch im Widerspruch zu der relativ geringen Menge der in der Kittsubstanz vorhandenen Lipoiden stehen dürfte.

Zusammenfassend können wir also bis jetzt sagen: Die Kittsubstanz der Hefezellen enthält ein nur in heißem Alkohol lösliches freies Phosphatid, wahrscheinlich Sphingomyelin. Die Hefezellmembran enthält einen Fehlingsche Lösung stark reduzierenden Komplex, von dem wir bereits aus anderen Untersuchungen wissen, daß in ihm Mannose und Glukose vorkommt²⁾, auch das Hefegummi enthält nach diesen Autoren Mannose und Glukose.

Wären diese Schlüsse schon ziemlich bedingt richtig, so mußten sie aber an noch einwandfreierem Material erhärtet werden, bei dem 100 Proz der Zellen zerstört, resp. abgebaut waren und so Trugschlüsse auszuschließen waren.

a) Die Kittsubstanz der Hefezelle.

Konnten wir oben bereits das Vorliegen eines freien Phosphatids in der Hefekittsubstanz nachweisen, so stellten wir bereits die weitere Frage, kommen auch an Eiweiß gebundene Lipoiden dort vor?

Material: Um einwandfreies Material zu erhalten, trockneten wir käufliche Bäckerhefe, indem wir sie mehrere Male mit Azeton in der Reibschale anrührten, abnutschten und mit der abgenutschten Hefe nochmals in der gleichen Weise wie vorher verfahren. Darauf wurde sie mehreremale mit Alkohol in der Reibschale verrührt, dann abgenutscht, zuletzt in der gleichen Weise mit Aether behandelt. Wir nahmen für 1 kg Hefe stets 2 Liter der betreffenden Extraktionsflüssigkeit. Wir wollten auf diese Weise die Möglichkeit gewinnen, sämtliche freien Lipoiden aus der Hefe zu isolieren, da diese bekanntlich nur in verschiedenen organischen Lösungsmitteln sämtlich löslich sind. Das so getrocknete Material wurde vor der weiteren Verarbeitung nochmals ½ Std. lang mit nicht zu wenig Aether im Schüttelapparat extrahiert und außerdem mit Alkohol ausgekocht und im Heißwassertrichter solange mit heißem Alkohol gewaschen, bis der zuletzt abfließende Alkohol beim Abkühlen einer Probe im Reagenzglas keine Trübung mehr erkennen ließ (andernfalls liegt noch Gegenwart von freiem Lipoid, das wir vorher schon in der Kittsubstanz nachgewiesen hatten, vor).

1) „Zur Gramschen Färbung“ Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. 1928.

2) Euler-Lindner, Chemie der Hefe u. d. alkohol. Gärung. (Akad. Verlagsgesellsch. Leipzig. 1915. S. 58).

Von der so gewonnenen, trockenen, von ungebundenen Lipoiden restlos befreiten Hefe wurden 50 g mit 500 cem 1:10 verdünnter Salzsäure 2 Std. lang im Schüttelapparat geschüttelt (zur Entfernung der Nukleinsäure). Nach mehrmaligem Auswaschen mit dest. Wasser wurden 500 cem 25proz. Salzsäurealkohol zugegeben und wiederum, diesmal aber 6 Std. lang geschüttelt, bis eine Probe der abzentrifugierten Hefe mikroskopisch absolut gramnegativ geworden war.

Bekanntlich verläßt bei dieser Behandlung die in kaltem Alkohol lösliche grampositive Lipoidsäure des Hefelipoproteids die Zelle, weshalb sie gramnegativ wird. Andererseits sahen wir oben, daß die Kittsubstanz schwach grampositiv ist. Da aber die so behandelten Zellen nach Auswaschen des Salzsäurealkohols durch Alkohol in der Zentrifuge, Anrühren mit dest. Wasser und nachfolgender Gramscher Färbung jetzt absolut gramnegativ geworden sind, so muß auch das in der Kittsubstanz vorhandene schwach grampositive Lipoid mit entfernt worden sein, also in kaltem Alkohol löslich gewesen sein, denn andernfalls müßte jetzt der Zellinhalt gramnegativ sein, die Kittsubstanz aber noch schwach grampositiv, was nicht der Fall ist. Daraus ergibt sich, daß die Kittsubstanz ein gebundenes, schwach grampositives Lipoprotein enthält. Die hierzu gehörige Lipoidsäure dieses Lipoproteids scheint chemisch identisch mit der Lipoidsäure des Endoplasmas zu sein oder zumindest ihr in ihrem chemischen Aufbau sehr nahe zu stehen, was nicht nur daraus hervorgeht, daß sie durch dieselben Maßnahmen aus der Zelle zu entfernen ist wie die Lipoidsäure des Endoplasmas (kalte Salzsäure-Alkoholbehandlung), sondern auch dadurch, daß wir bereits früher¹⁾ in der Lage waren, an den gramnegativ gemachten Hefezellen durch Behandlung mit einer alkoholischen Lipoidsäurelösung sowohl das Lipoprotein des Endoplasmas zu regenerieren, als auch dasjenige der Kittsubstanz.

Dieses hiermit histochemisch in der Kittsubstanz nachgewiesene grampositive Lipoprotein, an dessen Aufbau eine grampositive in kaltem Alkohol lösliche Lipoidsäure beteiligt ist, ist auch makrochemisch zu isolieren, wenn man die mit CaCO_3 zerriebenen und mit heißem Alkohol (Entfernung des freien Sphingomyelins aus der Kittsubstanz) extrahierten Zellmembranen mit Salzsäurealkohol schüttelte. Dann ist aus dem mit Natronlauge neutralisierten HCl-Alkohol nach Gewinnung des Rückstandes und dessen schwacher Ansäuerung mit Salzsäure, die am Aufbau der Kittsubstanz beteiligte, schwach grampositive Lipoidsäure mit Äther extrahierbar und nach Verdunsten des Äthers zu gewinnen. Ein Teil der so gewonnenen Substanz stammt natürlich auch von den grampositiven Lipoproteiden der wenigen intakten Zellen, die in der mit Kalziumkarbonat zerriebenen Hefe noch zugegen waren.

Weiter müssen wir uns fragen, ist das soeben nachgewiesene grampositive Lipoid der Kittsubstanz das einzige dort vorkommende gebundene Lipoid, oder kommen dort noch weitere gebundene Lipide, weitere Lipoidweißverbindungen vor? Das ist der Fall, wie gleich bewiesen werden soll.

Orientierender Versuch: Wir benutzten dazu die eingangs der Arbeit erwähnte mit kalter Salzsäure nukleinsäurefrei und mit kaltem Salzsäurealkohol gramfrei gemachte Hefe, die vor ihrer Verarbeitung mit Äzeton, kaltem Alkohol, Äther und heißem Alkohol absolut von ungebundenen Lipoiden befreit worden war. Kochen wir nun die so erhaltene Hefe, in der etwa gebundene Lipide jetzt in Freiheit gesetzt sein müssen durch die Salzsäurebehandlung, mit heißem Alkohol aus, so scheidet der Alkohol beim

1) „Zur Gramschen Färbung“. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. 1928. (Im Erscheinen).

Erkalten wiederum wie früher bei der Behandlung der unvorbehandelten Zellmembranen jenen charakteristischen, weißen Niederschlag aus.

Da die Hefezellen vorher absolut von ungebundenen Lipoiden durch Azeton, Alkohol, Aether und heißen Alkohol befreit worden waren, um zu wiederholen, und jetzt nach der Salzsäurehydrolyse nochmals mit heißem Alkohol offenbar dasselbe Lipoid wie vorher isoliert werden kann, so muß dieses Lipoid primär gebunden vorgelegen haben. Denn anderenfalls hätte es vorher bereits durch den Alkohol in der Hitze entfernt worden sein müssen, da wir ja auch nachdrücklichst darauf geachtet haben, daß der abfließende Alkohol beim Erkalten keinen Niederschlag mehr gab, was die Anwesenheit noch weiterer ungebundener Mengen von freiem Lipoid angezeigt hätte. Auch dieses Lipoid ist ein stickstoff- und phosphorhaltiger Körper, der aus denselben Gründen wie oben aller Wahrscheinlichkeit nach Sphingomyelin ist.

Stammt nun dieses dritte Lipoid aus der Kittsubstanz oder dem Endoplasma der Hefe, da die Zellmembranen ja keine Lipide, weder freie noch gebundene enthalten, wie die Vitalfärbung mit der Viktoriablaubase beweist?

Zu diesem Zweck wurden die nach der oben mitgeteilten Technik in der Kälte nukleinsäure- und gramfrei gemachten Hefezellen mit 140 ccm 10proz. Natronlauge versetzt, $\frac{1}{4}$ Std. lang geschüttelt, dann mit 860 ccm Wasser aufgefüllt und nochmals $\frac{1}{4}$ Std. lang geschüttelt. Hierdurch geht das Eiweiß des Hefeendoplasmas in Lösung, was dadurch bewiesen werden kann, daß man es aus der alkalischen Lösung durch Essigsäure, besser noch durch Essigsäure + Ferrozyankalium als Niederschlag ausfällen kann. Zentrifugiert man aber jetzt die Flüssigkeit, so bleiben die schneeweißen Zellmembranen zurück. Die abzentrifugierten Zellmembranen¹⁾ wurden noch zweimal ebenso mit Natronlauge und dest. Wasser behandelt, wobei sich beim Abzentrifugieren am Schluß nicht alle Membranen mehr glatt absetzten, sondern eine schleimig weiße Flüssigkeit über den abzentrifugierten Membranen sitzen bleibt. Diese läuft durch kein Filter. Mikroskopisch erweist sich diese Flüssigkeit ebenfalls aus Zellmembranen bestehend. Sie wurde der bequemeren Verarbeitung wegen abgessogen und nur die am Boden des Zentrifugenglases befindlichen Zellmembranen weiter verarbeitet. Diese wurden nachdem die dritte Natronlauge mit Essigsäure und Ferrozyankalium klar blieb, die Zellen also vollkommen eiweißfrei geworden waren, noch 8mal mit dest. Wasser in der Zentrifuge gewaschen (zur Entfernung der Natronlauge und des darin gelösten Hefe-eiweißes). Darauf wurden sie 2mal mit kaltem 96proz. Alkohol gewaschen, dann mit absolutem Alkohol, darauf mit Aether in dem Zentrifugenglas angerührt und auf der Nutsche zur Trockne gebracht, wodurch man eine schneeweiße Masse erhält, die sich gut pulverisieren läßt. Sie besteht zu 100 Proz. aus Zellmembran + Kittsubstanz.

Ein Teil dieser so gewonnenen reinen Zellmembranen wird alsdann mit heißem Alkohol ausgekocht und durch Heißwassertrichter filtriert. Der Alkohol trübt sich wieder stark beim Erkalten wie vor Entfernung des Hefezellinhaltes durch Natronlauge. Da andererseits der aus der Lösung in Natronlauge mit Ferrozyankalium + Essigsäure gefällte, ausgewaschene und zur Trockne gebrachte Hefezellinhalt beim Auskochen und Filtrieren im Heißwassertrichter einen Alkohol gibt, der nur ganz unbedeutend sich beim Erkalten trübt, so geht aus diesen Versuchen wohl einwandfrei hervor, daß der Hauptteil des oben aus den Zellen nach deren Hydrolyse durch heißen Alkohol extrahierten, vorher gebunden vorgelegenen, gramnegativen Lipoids in der Kittsubstanz seinen Sitz haben muß und nicht im Endoplasma der nukleinsäure- und gramfreien Hefe.

1) Wurde die nukleinsäure- und gramfreie Hefe vorher mit heißem Alkohol extrahiert, dann gewinnt man durch Behandlung mit Natronlauge keine Zellmembranen, da alsdann das Hefe-eiweiß irreversibel durch die Hitze koaguliert wird und dann nicht mehr durch Natronlauge in Lösung geht.

Chemische Zusammensetzung des dritten, aus der Kittsubstanz isolierten Lipoids.

Dieses Lipoid zeigt ähnliche Eigenschaften wie das in der Kittsubstanz bereits zuerst nachgewiesene freie Phosphatid.

Physikalische Eigenschaften: Löslich nur in heißem Alkohol, aus dem es beim Erkalten ausfällt.

Histochemisches Verhalten: Abzentrifugiert und auf Objektträger ausgestrichen färbt es sich nenneswert nur mit Viktoriablau und besonders, mit der Viktoriablau base, Tannin-Safranin negativ (also eiweißfrei). Gramsche Färbung: negativ.

Chemisches Verhalten: Nach der Hydrolyse mit konz. Salzsäure wird Fehlingsche Lösung nicht reduziert. Verascht erweist es sich wie das erste, frei vorliegende Phosphatid als Phosphorsäure- und Stickstoffhaltig (Lasseignesche Probe).

Auch hier scheiden Zerebroside für die Zusammensetzung dieses Lipoids aus wegen mangelnder Reduktionsfähigkeit nach Hydrolyse. Eben- sowenig kommt Lezithin in Frage, da die Substanz nur in heißem Alkohol löslich ist. Aus diesem Grund kommen auch für die chemische Natur dieses Phosphatids nur das Kephalin und das Sphingomyelin als am wahrschein- lichsten in Frage. Da andererseits aber Kephalin in Aether löslich ist und wir in einem weiteren Versuch feststellen konnten, daß aus dem Alkohol das be- treffende Lipoid beim Erkalten auch dann noch ausfällt, wenn die Zellmem- branen vorher mit Aether extrahiert worden waren, so dürften wir auch hier nicht fehl gehen, wenn wir in dem vorliegenden Lipoid Sphingomyelin erkennen, wenn der unbedingt exakte Nachweis auch erst durch den Nachweis des Cholins und des Sphingosins als erbracht angesehen werden kann, was mit größeren Substanzmengen gelegentlich noch nachgeholt werden soll.

Zusammenfassend können wir also sagen, daß dieses dritte in der Kitt- substanz enthaltene Lipoid ebenfalls Sphingomyelin sein dürfte, das aber zum Unterschied des zuerst nachgewiesenen Sphingomyelins nicht frei ursprüng- lich in der Kittsubstanz zugegen war, sondern chemisch gebunden, denn anderenfalls hätte es bereits aus den nicht vorbehandelten Hefezell- membranen extrahierbar sein müssen und nicht erst nach Salzsäurehydrolyse seine Extraktionsfähigkeit erlangt haben.

Wir treffen ähnliche Dinge ja des öfteren an. Wir wissen, daß in der Hefe sowohl freie Nukleinsäure vorkommt als auch an Eiweiß gebundene in den Nukleoproteiden, wir sehen in der Hefe freie Lipide und an Eiweiß ge- bundene in den Lipoproteiden, hier erkennen wir freies Sphingomyelin und an Eiweiß gebunden vorkommendes. Auch aus diesem Lipoid, das ebenfalls wie das erste bei der Salzsäurehydrolyse zuerst gelb, dann braun wird, läßt sich die an seinem Aufbau beteiligte Fettsäure aus der Hydrolysenflüssigkeit durch Aether ausschütteln und frei als gelbbraune Masse gewinnen, die sich wie in der Zelle weder mit Methylenblau noch mit Fuchsin färbt, gramnegativ ist und auch nur die Viktoriablau base annimmt. Eine intensivere Färbung tritt aber sofort bei der Färbung mit der Viktoriablau base ein, wenn man diese in Eukalyptol gelöst darauf einwirken läßt.

Untersucht man die zurückbleibenden Zellmembranen, resp. ihre Kitt- substanz auf weitere Lipide, so erkennt man, daß sie sich auch nach dieser Behandlung noch mit Viktoriablau schwach färben, also noch weitere Lipide enthalten. Diese verlieren sie erst beim Auskochen mit alkoholischer Salzsäure,

da, wie bereits in früheren Arbeiten mitgeteilt, hier Plasteoproteide¹⁾ wie auch im Endoplasma der Hefe vorliegen, (die wir in den oben zitierten Versuchen vorher mit Natronlauge extrahiert hatten und dort schlechtweg als Hefeeiweiß bezeichnet hatten). Aus der salzsäurealkoholischen Hydrolysenflüssigkeit läßt sich alsdann nach Neutralisation mit Natriumkarbonat in Substanz und schwacher Ansäuerung mit Salzsäure die der Plastinsäure zugehörige Fettsäure ebenfalls als braungelbe Masse isolieren, die sich auch hier nenenswert nur mit der Viktoriablaubase intensiv blau färbt, besonders bei Verwendung ihrer Lösung in Eukalyptol. Die alkoholische Lösung dieser Fettsäure entfärbt ebenfalls wie früher die alkoholische Lösung der Lipoidsäure mit Natriumkarbonat rot gefärbtes Phenolphthalein.

Damit ist in der Kittsubstanz noch ein viertes gebunden vorliegendes Lipoid nachgewiesen, das zum Unterschied von den übrigen drei durch kalte Salzsäure nicht hydrolysiert wird, sondern erst durch Salzsäure in der Siedehitze.

Eigenschaften dieser in der Kittsubstanz nachgewiesenen Lipoide.

	In kaltem Alkohol	In heißem Alkohol	Nach HCl-Hydrolyse in kaltem Alkohol	Nach Salzsäure-Hydrolyse in heißem Alkohol	P-Gehalt	N-Gehalt	Fettsäuregehalt	Zucker-gehalt
freies Lipoid (Sphingomyelin)	— ²⁾	+	.	.	+	+	+	—
grampositives Lipoproteid	—	—	+	+	+	+	+	—
gramnegatives Lipoproteid (Sphingomyelin-Eiweißverbindung)	—	—	—	+	+	+	+	—
gramnegatives Plasteoproteid	—	—	—	— (löslich erst bei heißer HCl-Alkoholhydrolyse)	?	?	+	—

Aus dieser Zusammenstellung in der Tabelle dürften die physikalischen und chemischen Eigenschaften der verschiedenen Lipoide etwas klarer hervorgehen.

b) Die Hefezellmembran.

Ein Teil der oben gewonnenen, reinen, schneeweißen Zellmembranen, die durch Natronlauge ihres Eiweißgehaltes und durch mehrmaliges Auskochen mit heißem Alkohol möglichst von den Lipoiden der ihnen noch beigemengten Kittsubstanz befreit worden waren, werden zur weiteren Analyse verwandt.

Versuch 1: Wurden wenige Gramm der Trockensubstanz mit 1:10 verdünnter (37proz.) konz. Salzsäure $\frac{1}{2}$ Std. lang gekocht, so reduzierte die Hydrolysenflüssigkeit nach Alkalisieren außerordentlich stark Fehlingsche Lösung.

Da die Membranen allein vor der Hydrolyse Fehlingsche Lösung nicht reduzierten, geht daraus hervor, daß durch die eintretende Hydrolyse ein reduzierender Komplex aus der Zellmembran abgespalten wird, da einmal sämtliche Lipoide der Kittsubstanz bei der Hydrolyse keinen Fehlingsche

1) Die zum Unterschied von allen anderen bis jetzt bekannten Lipoid-eiweißverbindungen erst durch HCl in der Siedehitze hydrolysiert werden. Hierüber s. auch Dermat. Wochenschr. 1928. VII. Mitt. „Zur Zellfärbung“.

2) — bedeutet unlöslich, + löslich.

Lösung reduzierenden Komplex abspalten und auch nicht die in ihrem Plasteoproteid noch enthaltene Plastinsäure, wie wir bereits zeigen konnten. Außerdem wurde auch untersucht, ob das durch NaOH aus den Zellen extrahierte Hefe-eiweiß einen Fehlingsche Lösung reduzierenden Komplex enthielt. Zu diesem Zweck wurde das mit Ferrozyankalium + Essigsäure gewonnene und mit Alkoholäther getrocknete Eiweiß mit HCl hydrolysiert. Die Hydrolysenflüssigkeit zeigte auch bei Verwendung von 7 g Substanz nur ganz minimale Reduktionskraft. Aus der blauen Kupfersulfatlösung fiel erst nach einigen Stunden ein ganz geringer gelbroter Bodensatz, während Fehlingsche Lösung außerordentlich stark reduziert wurde, selbst wenn nur 0,2 g Substanz der Zellmembranen der Hydrolyse unterworfen und mit Fehlingscher Lösung untersucht worden waren.

Da von anderen Autoren (Euler-Lindner l. c.) bereits Mannose und Glukose in der Zellmembran nachgewiesen worden war, gehen wir vorerst wohl in der Annahme nicht fehl, daß Zuckermoleküle am chemischen Aufbau der Zellmembranen der Hefe beteiligt sind. Da andererseits aber auch an die Möglichkeit des Vorliegens von Glukosamin gedacht werden muß, das bekanntlich ebenfalls stark Fehlingsche Lösung reduziert, wurde in einem weiteren

Versuch 2: ein anderer Teil der trockenen Zellmembranen auf einen etwaigen Stickstoffgehalt geprüft. Die Lasseignesche Probe fällt positiv aus. Damit ist Stickstoff in der Hefezellmembran nachgewiesen. Der Stickstoff konnte nun einmal von Lipoidresten herkommen, die in der Kittsubstanz noch vorhanden sind, wie wir oben bereits nachweisen konnten, des weiteren konnte er von Glukosamin herrühren, endlich von anwesendem Eiweiß. Eine Veraschung einer weiteren Probe der trockenen Zellmembranen ergibt ferner einen positiven Phosphorsäurebefund mit Ammoniummolybdat. Damit erscheint unsere Vermutung richtig, daß der Stickstoffgehalt noch von Lipoidresten in der Kittsubstanz herrühren dürfte, die wir bereits histochemisch (durch die Färbung mit der Viktoriablaubase) und makrochemisch (durch heiße Hydrolyse mit Salzsäurealkohol) als Plasteoproteide nachgewiesen hatten und die mechanisch bis jetzt nicht von der Zellmembran zu trennen sind. Aus der Vitalfärbung mit der Viktoriablaubase geht aber einwandfrei hervor, daß sie nicht in der Zellmembran ihren Sitz haben, die dabei wie schon erwähnt, absolut farblos erscheint.

Der positive N- und P-Gehalt dürfte also unschwer auf noch vorhandene Lipidreste in der Kittsubstanz zurückzuführen sein.

Deswegen bestand aber dennoch weiterhin die Möglichkeit, daß trotzdem auch Glukosamin- und Eiweiß-N in der Zellmembran zugegen waren. Nun ist durch eine Arbeit von Meisenheimer¹⁾ bereits Glukosamin in der Hefe nachgewiesen worden.

Meisenheimer hydrolysierte autolysierte Zellrückstände²⁾ mehrere Stunden mit Salzsäure am Rückflußkühler, wobei er ebenfalls die eintretende Braunfärbung der Hydrolysenflüssigkeit beobachtete, aus der wir oben mit Äther eine hydrolytisch abgespaltene Fettsäure isolieren konnten, die durch Huminsubstanzen noch verunreinigt gelbbraun aussah, beim Schütteln ihrer ätherischen Lösung mit Kohle aber rein weiß zu erhalten ist. Ließ Meisenheimer den bei seinen Versuchen erhaltenen braunen Sirup längere Zeit stehen, so schieden sich allmählich schöne farblose Kristalle ab, die die typischen Reaktionen des Glukosamin-Chlorhydrats zeigten: Leichte Löslichkeit in Wasser, schwerere in Alkohol. Sie war ferner aschefrei, reduzierte Fehlingsche Lösung in der Kälte langsam, momentan beim Erwärmen. Aus Wasser

1) Ztschr. f. physiol. Chemie. Bd. 104. S. 235 ff.

2) Die nach unserer schon oben mitgeteilten Erfahrung nicht völlig frei von Hefeeiweiß sind, sicherlich aber sehr eiweißarm waren.

kristallisierte sie in der charakteristischen Form und besaß dann auch die richtige Zusammensetzung und Drehung.

Damit ist die Anwesenheit von Glukosamin bewiesen und da Meisenheimer einen autolysierten Zellrückstand verwendete, dürfte durch unsere und seine Versuche die Anwesenheit von Glukosamin in der Zellmembran der Hefe sichergestellt sein. Die aufgefundene Menge von Glukosamin (1,6 g von 100 g Zellrückständen) erscheint Meisenheimer recht gering und glaubt er annehmen zu dürfen, daß bei dem erforderlichen längerem Kochen mit Salzsäure ein großer Teil des vorhandenen Glukosamins zerstört worden sei.

Nach unseren Untersuchungen erscheint die Glukosaminmenge nur so gering, während sie in Wirklichkeit recht groß ist. Wir erhielten aus 1000 g frischer Bäckerhefe bei Trocknung mit Azeton, Alkohol und Aether 240 g Trockensubstanz. Nach Entfernung der Nukleinsäure und der Lipoidsäure verblieben 124 g Trockensubstanz, so daß die Hefe durch die Entfernung der genannten Substanzen ungefähr die Hälfte ihres Gewichtes an Trockensubstanz verloren hatte. Aus diesen 124 g Rückstand erhielten wir aber nur 5,9 g trockene Zellmembranen. Da Meisenheimer 100 g Zellrückstände verarbeitete, so würde das einer Menge von 4,7 g nach unserer Methode gereinigter trockener Substanz der Zellmembranen entsprechen. Daraus konnte er wohl nicht gut mehr als 1,6 g Glukosamin bekommen. Wenn Meisenheimer im Verhältnis zur Ausgangssubstanz prozentualiter so wenig Glukosamin erhielt, so liegt das daran, daß seine autolysierten Hefezellen, wie oben schon betont, nicht unerhebliche Mengen von Hefeeiweiß noch enthielten¹⁾, dazu die Lipotide der Kittsubstanz. Bei unserem gereinigten Präparat ergeben sich dadurch ganz andere Zahlenverhältnisse: Der Glukosamingehalt der Zellmembranen berechnet sich danach auf ca. 34 Proz. der Substanz der Hefezellmembranen.

Wie bereits oben betont, mußte aber auch daran gedacht werden, daß die Hefezellmembranen außer dem Stickstoffgehalt der berechneten 34 Proz. Glukosamin²⁾ auch noch Eiweißstickstoff enthielt. Denn die restlichen 66 Proz. der Hefezellmembransubstanz mußten ja noch durch eine andere Substanz in Anspruch genommen sein. Färbten wir nun die so gewonnenen Zellmembranen mit Erythrosin, so färbten sie sich mit diesem sauren Farbstoff noch sehr intensiv, mußten also noch eine basische Substanz, aller Wahrscheinlichkeit nach Eiweiß enthalten, wofür auch die Bindungsfähigkeit der so gewonnenen Zellmembranen für das saure Tannin weiterhin spricht, die durch eine darauffolgende Färbung mit Safranin noch unschwer zu erkennen ist.

Wurden nun in weiteren Versuchen die trockenen Zellmembranen mit Salpetersäure gekocht, so ergaben sie eine positive Xanthoprotein-Reaktion. Nach Kochen mit Natronlauge und nachfolgender Abkühlung zeigten die Zellmembranen positive Biuret-Reaktion. Auch die Adamkiewiczzsche Probe fiel positiv aus. Damit war die Gegenwart von Eiweiß in der Hefezellmembran sichergestellt und man konnte daran denken, daß die Hefezellmembran aus einer Kohlehydrat- resp. Glukosamin-Eiweißverbindung bestand, welche Verbindungen wir gewöhnlich als Glukoproteide bezeichnen.

Diese sind zusammengesetzte Eiweißkörper, Verbindungen von Eiweißstoffen mit einem Kohlehydrat oder einer Gruppe, an deren Aufbau Kohlenhydrate beteiligt sind. Sie enthalten weniger N und C dafür mehr O und S als die einfachen Eiweißstoffe und reduzieren nach dem Kochen mit Säuren beim Erhitzen Kupferoxyd in alkalischer Lösung. Sie reagieren sauer

1) Was durch seine mitgeteilten Endanalysen außerdem bewiesen wird.

2) Die also noch nicht als endgültig feststehend gelten können, da sich die Berechnung auf die etwas anders angestellten Versuche von Meisenheimer bezieht.

und bilden mit Alkalien in Wasser leichtlösliche Verbindungen. Die prosthetische (Kohlehydrat enthaltende) Gruppe ist, soweit die Untersuchungen reichen, entweder die glukosaminhaltige Mukoitinschwefelsäure oder die chondrosaminhaltige Chondroitinschwefelsäure¹⁾.

Auch Eisenberg denkt bereits an das evtl. Vorliegen von „Glykoproteiden“ in der Kapsel mancher Bakterien, zumal ein Zusammenhang zwischen Kapselbildung und Kohlehydratdarreichung zu bestehen scheine, indem diese die Kapselbildung begünstige²⁾.

Gegen das Vorliegen von Glukoproteiden in der Hefezellmembran sprach aber in unseren Untersuchungen die Basizität des Eiweißes, die bei der Erythrosin- und Tannin-Safraninfärbung eklatant in Erscheinung trat, während die Glukoproteide ja saure Körper darstellen. Außerdem sind sie, wie erwähnt, in Alkalien löslich, die Substanz der Hefezellmembran dagegen gerade nicht.

Unsere weitere Analyse erstreckte sich daher darauf, ob noch einige andere Elemente in den Zellmembranen vorhanden sind. Wurden die mit Soda-Salpeter veraschten Zellmembranen mit Salzsäure aufgenommen, so entstand mit Bariumchlorid deutlich Trübung durch entstehendes Bariumsulfat. Es ist erforderlich, daß man bei dieser Prüfung auf Schwefel die Röhren einige Zeit stehen läßt, da bei geringen Substanzmengen die Trübung von BaSO_4 erst nach einiger Zeit auftritt. Nach Feststellung des Schwefelgehaltes fahndeten wir fernerhin nach einem etwaigen Eisengehalt, der uns besonders deshalb wichtig erschien, da das Vorkommen maskierten Eisens in der Zellmembran für die Atmungsprozesse der Hefe von nicht unwesentlicher Bedeutung sein dürfte. Es ließ sich deutlich in dem veraschten und mit Salzsäure aufgenommenen Rückstand der Zellmembranen Eisen nachweisen. Sowohl mit Ferrozyankalium entstand deutliche Blaufärbung, als auch mit Rhodankalium Rotfärbung.

Fassen wir zusammen, so finden wir in der Hefezellmembran einen Fehling-sche Lösung reduzierenden Komplex, dessen reduzierende Fähigkeiten an die Gegenwart von Glukosamin gebunden sein dürften, zumal wir ebenfalls hier keine Pentose nachweisen konnten, wie noch nachzutragen sei.

Außerdem gelang uns der Nachweis, daß am Aufbau der Hefezellmembran ein basisches Eiweiß beteiligt ist, das wir sowohl histochemisch durch die Färbung mit Erythrosin und Tannin-Safranin als auch makrochemisch durch die Xanthoprotein-, Biuret- und Adamkiewczsche Probe nachzuweisen in der Lage waren. Dieses Eiweiß enthält N und P, wenn wir auch einen Teil des gefundenen N und P auf die Gegenwart von noch geringen Lipoidresten der der Zellmembran noch beigemengten Kittsubstanz zurückführen müssen. Des weiteren finden wir geringe Mengen S und Fe. Daraus ergibt sich, daß im wesentlichen ein eisenhaltiges, basisches Phosphorprotein in der Hefezellmembran vorliegt, das nach Kochen mit Salzsäure Glukosamin abspaltet, wir es also im wesentlichen mit einem

Phosphorglukoprotein

zu tun haben, das, seiner chemischen Zusammensetzung nach von bekannten Eiweißkörpern, am ehesten dem Ichthulin aus Karpfeneiern nahe stehen dürfte.

1) Zitiert nach Steudel, S. 550. Handb. d. physiol. u. pathol. chem. Analyse von Thierfelder, 9. Aufl. Berlin, Julius Springer, 1924.

2) Eisenberg, Handb. d. mikrobiol. Technik von Kraus-Uhlenhuth. Bd. 1. S. 230. Berlin-Wien, Urban u. Schwarzenberg, 1923.

Zusammenfassung.

Die Membran der vegetativen Hefezelle enthält keine Lipoide oder deren Eiweißverbindungen und besteht im wesentlichen aus einem Schwefel-, Eisen- und glukosaminhaltigen Phosphorglukoproteid.

Die der Hefezellmembran aufliegende Schicht, ihre Kittsubstanz, enthält ein an Eiweiß gebundenes, grampositives Lipoid, sowie ein freies, N- und P-haltiges, nur in heißem Alkohol lösliches Lipoid, das wahrscheinlich mit Sphingomyelin identisch ist oder ihm sehr nahe steht. Dieses Lipoid findet sich nochmals dort an Eiweiß gebunden vor. Außerdem konnte das Vorkommen von Plasteoproteiden in der Kittsubstanz festgestellt werden.

Die Zellmembran der Hefesporen dagegen besteht aus Lipoideiweißverbindungen¹⁾.

Nachdruck verboten.

Ueber die Anfertigung von Schimmelpilzpräparaten für Kurszwecke.

[Aus dem Städtischen Hygienischen Universitäts-Institut Frankfurt a. M.]

Von Dr. E. Klieneberger.

Mit 4 Abbildungen im Text.

K. v. Angerer und A. Hartmann geben in der Abhandlung „Zur Technik der Schimmelpilzuntersuchung“²⁾ eine Methode zur Herstellung „anschaulicher und haltbarer Schimmelpilzpräparate“ für Kurszwecke an. Mit Recht betonen sie, daß die in den Kursen gebräuchlichen Zupfpräparate gewöhnlich wenig instruktiv ausfallen. Sie schlagen deshalb Untersuchung der Hyphomyceten an Mikrotomschnitten vor.

Es sei gestattet, kurz auf eine viel einfachere Methode, die ebenfalls ganz klare Bilder gibt und sich für Kurszwecke deshalb besonders eignet, hinzuweisen: Zum Studium der mikroskopisch kleinen Pilze benutzt man allgemein die Kultivierung in einem am Deckgläschen hängenden Tropfen in der „feuchten Kammer“. Diese Methode hat den Vorzug, daß das Wachstum von Tag zu Tag unter dem Mikroskop beobachtet werden kann. Unter Verwendung des Prinzips der „feuchten Kammer“ lassen wir die Kursteilnehmer in folgender Weise Präparate anfertigen: Ein Objektträger wird in der Flamme sterilisiert, eine kleine Oese (1—2 mg fassend) flüssigen Bierwürzagars darauf erbsengroß ausgebreitet und mit einer dünnen Platinnadel ein wenig Sporenmaterial von einer Schimmelpilzkultur aufgetragen. Die so beimpften Objektträger werden im feuchten Luftraum entweder bei Zimmertemperatur oder zur Beschleunigung der Entwicklung der Kulturen auf dem Brutschrank aufbewahrt. Schon nach 24 Std. sind die Sporen ausgekeimt; nach mehreren Tagen ist ein feiner, kreisförmig ausgebreiteter, zierlicher Rasen auf jedem Objektträger entstanden, an dessen

1) Hierüber s. d. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 98. S. 76 ff.

2) Arch. f. Hyg. Bd. 96. 1926. S. 227.

Rand, der über das kleine Nährbodenfeld hinausgewachsen ist, besonders klar die Bildung der Sporenträger unter dem Mikroskop beobachtet werden kann. Im allgemeinen wird für die Kursteilnehmer die Betrachtung dieser lebenden Objektträgerkulturen mit schwächeren Vergrößerungen ohne weiteres Hilfsmittel und mit starken Vergrößerungen (Oelimmersion) nach Benetzen mit Alkohol im Wassertropfen (Deckglas) genügen.



Fig. 1.

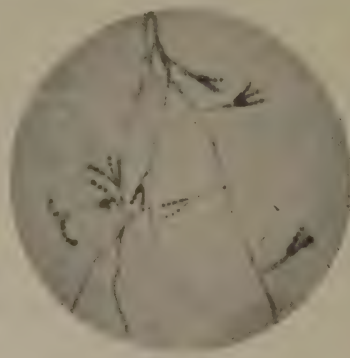
Fig. 1. *Aspergillus niger* (schwach vergrößert).

Fig. 2.

Fig. 2. *Penicillium glaucum* (stark vergrößert).

Fig. 3.

Fig. 3. *Aspergillus glaucus* (stark vergrößert).

Fig. 4.

Fig. 4. *Aspergillus glaucus* (sehr stark vergrößert).

Dauerpräparate in beliebigem Stadium der Objektträgerkulturen lassen sich leicht in folgender Weise anfertigen. Man benetzt die kleine, etwa pfennig-große Kultur mit Alkohol, ersetzt den Alkohol durch Wasser und färbt mit 1—2 Tropfen wässriger Methylenblaulösung, die man wieder durch einige Wassertropfen teilweise entfernt. Dann saugt man mit Filtrierpapier die Flüssigkeit ab und bringt einen Tropfen flüssiger Glyzeringelatine auf die Kultur, die man schließlich mit einem Deckgläschen bedeckt. Solche Präparate halten sich einige Jahre: eine andere Färbung würde ihre Haltbarkeit vermutlich noch wesentlich verlängern.

Die Abbildungen zeigen Photographien verschiedener solcher Präparate.

Die Vorteile unserer Methode bestehen im Anlegen kleiner Kulturen direkt auf dem Objektträger ohne Deckglas in einem winzigen Tröpfchen festen Nährbodens, das die kleine Kultur fixiert und dadurch das Anfertigen eines gefärbten Dauerpräparates von der ganzen Kultur ermöglicht, die besonders klare mikroskopische Bilder am Rande liefert, wo sie über das Nährbodentröpfchen hinausgewachsen ist und ohne Zwischenschicht dem Glase aufliegt.

Nachdruck verboten.

Zur Brauchbarkeit des Indolnachweises nach Kovács.

[Aus dem Staaatlichen Veterinär-Untersuchungsamt Potsdam (Leiter: Veterinär-Rat Dr. Standfuß).]

Von Dr. E. Lehr.

Auf der Tagung der Wiener Gesellschaft für Mikrobiologie teilte im Oktober des vorigen Jahres Kovács ein neues Verfahren zum Nachweise von Indol mit, dem er in gewisser Beziehung eine Ueberlegenheit über die anderen gebräuchlichen Verfahren beizumessen schien (vgl. Bericht im Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. Abt. I. Ref. Bd. 88. 1928. S. 430). Nach seinen Angaben werden 5,0 g Paradimethylamidobenzaldehyd in 75,0 ccm Amylalkohol und 25,0 ccm konzentrierter Salzsäure gelöst. Von dieser Lösung werden 25—30 Tropfen (nach meinen Vergleichen ungefähr 1,5 ccm) dem beschickten und bebrüteten Nährboden zugefügt. Nach diesem Zusatz wird das Reagensröhrchen mehrmals geschwenkt, ohne jedoch die sich mühelos überschichtenden Flüssigkeiten durch Schütteln innig miteinander zu vermischen. Nach Ablauf einiger Minuten soll sich die überstehende Paradimethylamidobenzaldehydlösung bei Anwesenheit von Indol rotviolett färben. Auf diese Weise sollte es möglich sein, in jedem Nährboden, auch in einfacher Fleischbrühe, Indolbildung durch entsprechend befähigte Keime nachzuweisen.

Gegenüber den bislang gebräuchlichen Verfahren, die alle einen besonderen Nährboden erfordern, würde die Verwendungsmöglichkeit eines jeglichen Nährbodens, auch gewöhnlicher Fleischbrühe, für den Indolnachweis eine nicht unwesentliche Vereinfachung und im viel beschäftigten Untersuchungsamte auch eine Ersparnis bedeuten. Grundlegende Bedingung ist jedoch, daß das Verfahren in Feinheit, Zuverlässigkeit und Augenfälligkeit anderen nicht nachsteht.

In diesem Gedanken habe ich die Angaben von Kovács zunächst gegen eine größere Anzahl bekannter, kräftiger Indolbildner (echte Coli-Stämme) geprüft. Den Kulturen wurde nach 24 Std. Bebrütungsdauer bei 37° die vorgeschriebene Menge der Kovácsschen Lösung zugefügt und im übrigen anweisungsgemäß verfahren. Dabei zeigte sich, daß die Wirkung sowohl bei Kultur in einem besonderen Indolnährboden (Tryptophan) als auch bei Kultur in gewöhnlicher Fleischbrühe schnell, kräftig und sicher eintritt. Beim Tryptophannährboden war die Wirkung erklärlicherweise ausgeprägter als in gewöhnlicher Fleischbrühe. Die an sich gelbliche Farbe der auf den eigentlichen Nährboden übergeschichteten Paradimethylamidobenzaldehydlösung wurde nach

einigen Minuten in Mahagoni-rotbraun umgewandelt. Der Gegensatz gegenüber Nichtindolbildnern — hierzu wurden bekannte, sicher nicht indolbildende Stämme aus der Paratyphus-Enteritisgruppe verwandt — war augenfällig und ließ sich ohne jede Schwierigkeit erkennen. Als ein unbedingter Vorteil erschien die überaus leichte Ueberschichtungsfähigkeit der wie Oel anmutenden Paradimethylamidobenzaldehydlösung über die Nährflüssigkeit.

Die Güte eines Verfahrens zum Nachweise von Indol läßt sich aber erst beurteilen, wenn es sich darum handelt, Indol bei Stämmen nachzuweisen, die dieses nur langsam und (infolgedessen) nur in geringer Menge bilden. Bislang wurde im hiesigen Untersuchungsamte mit sehr zufriedenstellendem Erfolge die Arbeitsweise von Zipfel angewandt. Ich habe daher auch dieses Verfahren zum Vergleich herangezogen. Die Versuchsanordnung wurde so gewählt, daß gleichzeitig aus derselben Agarkultur mit der gleichen Menge (eine Normalöse) 2 Tryptophannährbodenröhrchen und 1 Röhrchen mit gewöhnlicher Fleischbrühe beimpft wurden. Die Bebrütungsdauer belief sich für alle Röhrchen gleichmäßig auf 24 Std. bei 37°. Eins der Tryptophanröhrchen wurde gemäß den Angaben von Zipfel entsprechend der Anweisung von Abel-Olsen überschichtet, während das andere und das Röhrchen mit der gewöhnlichen Fleischbrühe nach den Angaben von Kovács behandelt wurden. In den Versuch wurden neben einigen bekannten kräftigen Indolbildnern und Nichtindolbildnern in der Hauptsache solche Stämme genommen, die mir von früheren Untersuchungen mit dem Verfahren nach Zipfel her als nur schwach indolbildende bekannt waren. Die nach Zipfel beschickten Röhrchen wurden sofort, die nach Kovács behandelten erstmalig nach dem einige Minuten in Anspruch nehmenden notwendigen Handgriffen und dann nach einer $\frac{1}{4}$, einer $\frac{1}{2}$, 1 und 3 Std. abgelesen.

Bemerkenswert sind aus diesen Versuchen im besonderen eine Anzahl schwach Indol bildender Stämme, bei denen die Ergebnisse bei den verschiedenen Verfahren und in den einzelnen Nährflüssigkeiten erheblich voneinander abwichen. Es handelte sich bei allen diesen Stämmen (Nr. 1—8) um Uebergangsstämme zwischen der ausgesprochenen Coli-Gruppe und der Paratyphus-Enteritisgruppe (zum Teil Pseudocoli nach Titze und Weichel, zum Teil Intermedius nach Standfuß und Verfasser).

Bei der Prüfung nach Zipfel stellten sich alle 8 Stämme deutlich und einwandfrei als Indolbildner heraus. Von den Stämmen Nr. 1—6 wurde verhältnismäßig viel Indol gebildet, vom Stamm Nr. 7 nur in recht geringer Menge und vom Stamm Nr. 8 zwar wenig, aber doch mehr als vom Stamme Nr. 7. Aber selbst bei dem sehr wenig Indol bildenden Stamme Nr. 7 war der bräunliche Ring an der Berührungsstelle der übereinander geschichteten Flüssigkeiten deutlich und zweifelsfrei zu erkennen. In allen Fällen trat der Erfolg unmittelbar nach dem Ueberschichten ein. Um einen Vergleichsmaßstab zu gewinnen, möchte ich die Stärke der Ergebnisse in Kreuzen ausdrücken, wobei + + + + die kräftigste Indolbildung anzeigen. In diesem Verhältnis bildeten Indol die Stämme Nr. 1—6 mit + + + +, der Stamm Nr. 7 mit + und der Stamm Nr. 8 mit + +.

Bei der Prüfung nach Kovács in Tryptophannährlösung zeichneten nach Ablauf einiger Minuten, die für die nötigen Handgriffe benötigt wurden, kräftig und deutlich mit mahagoni-rotbrauner Verfärbung die Stämme Nr. 1—5, erkennbar weniger kräftig der Stamm Nr. 6. Bei den Stämmen Nr. 7 und 8 war zunächst überhaupt kein Erfolg zu erkennen. Nach Ablauf einer Viertelstunde konnte der Ausschlag äußersten Falles als fraglich bezeichnet werden. Lediglich im Vergleich mit beimpften und unbeimpften Gegenversuchen unter Benutzung von Nichtindolbildnern war eine um ein Geringes dunklere Färbung

der übergeschichteten Paradimethylamidobenzaldehydlösung wahrzunehmen. Nach Ablauf der in der Mitteilung vorgeschriebenen Stunde war die Färbung noch etwas kräftiger und dunkler geworden, ohne indessen den als bejahend geltenden und im Versuch mit kräftigen Indolbildnern als zutreffend erkannten rotvioletten (Kovács) oder mahagoni-rotbraunen Farbenton zu erreichen. Immerhin war ein Unterschied gegenüber den Nichtindolbildnern unverkennbar. Erst nach 3 Std. hatte sich der Farbenton so verstärkt, daß er wahrnehmbar in das Rötliche hinüber spielte. Auch die Wirkung des Versuches mit dem Stamm Nr. 6 nahm erst im Laufe der Gesamtbeobachtungszeit bis zur vollen Stärke zu. In die Kreuzwertung übertragen, boten die 3 besonders schwach indolbildenden Stämme folgendes Bild: Stamm Nr. 6 zunächst ++, nach einer Viertelstunde +++ und nach einer ganzen Stunde ++++. Die Stämme Nr. 7 und 8 zunächst ohne jede Wirkung, nach einer Viertelstunde fraglich, nach einer Stunde + und nach 3 Std. ++.

Bei der Prüfung auf Indolbildung nach Kovács in gewöhnlicher Fleischbrühe blieb zunächst bei allen Stämmen 8 nach einigen Minuten jeglicher Erfolg aus. In der Mehrzahl der Fälle trat er auch nach Stunden nicht ein. Nur die Stämme Nr. 2, 5 und 6 zeigten nach einer Viertelstunde eine ganz geringfügige Indolbildung, die sich ungefähr in den Grenzen der im vorigen Abschnitt als fragliche bezeichneten hielt. Nach Ablauf 1 Std. konnte der Farbenton bei allen 3 Stämmen bestenfalls mit + gekennzeichnet werden. Beim Stamm Nr. 2 blieb er auch nach 3 Std. nur in gleicher Stärke bestehen, während die Stämme Nr. 5 und 6 in dieser Zeit noch um so viel zunahmen, daß die Stärke von ++ als erreicht gewertet werden konnte.

Stellt man die Ergebnisse aller 3 Prüfungen, soweit sie schwach indolbildende Stämme umfassen, zusammen, so ergibt sich das Bild der folgenden Uebersicht:

Indolnachweis nach:	Zeit	Stamm Nr.							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Zipfel in Tryptophan-Nährboden	sofort	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+	++
Kovács in Tryptophan-Nährboden	nach einigen Minuten	++++	++++	++++	++++	++++	++	—	—
	¼ Stunde	+++	?	?
	1 Stunde	++++	+	+
	3 Stunden	++	++
Kovács in gewöhnlicher Fleischbrühe	nach einigen Minuten	—	—	—	—	—	—	—	—
	¼ Stunde	—	?	—	—	?	?	—	—
	1 Stunde	—	+	—	—	+	+	—	—
	3 Stunden	—	+	—	—	++	++	—	—

Aus dem Gesagten erhellt, daß das von Kovács angegebene Verfahren sich für den Nachweis einer kräftigen Indolbildung auch in gewöhnlicher Fleischbrühe ebensogut eignet wie das Zipfelsche Verfahren. Bei einer weniger starken Indolbildung aber gelingt der Nachweis des Indols auch in besonderen Nährböden nur unvollkommen und unsicher. Teilweise war die Umfärbung der Paradimethylamidobenzaldehydlösung in der angegebenen Zeit so wenig ausgeprägt, daß nur ein besonders aufmerksamer Vergleich mit sicheren Nichtindolbildnern ein abschließendes Urteil ermöglichte. Demgegenüber war selbst

bei sehr schwachen Indolbildnern der sich bei der Untersuchung nach Zipfel und Abel-Olsen an der Berührungsstelle der Flüssigkeiten bildende bräunliche Ring stets deutlich erkennbar ausgeprägt. In dieser Anhäufung des sich bildenden Farbstoffes an einer räumlich eng begrenzten Stelle zwischen zwei anders gefärbten Flüssigkeiten liegt an sich schon eine leichtere Erkennbarkeit stattgefundener Indolbildung als in einer sich in ihrer Gesamtheit bei schwachen Indolbildnern nur verschwommen bemerkbar machenden Verfärbung der Ueberschichtungs- oder Gesamtflüssigkeit. Vollkommen im Stich läßt das Verfahren nach Kovács, wenn man statt eines besonderen Nährbodens bei schwachen Indolbildnern gewöhnliche Fleischbrühe verwendet. Mit dieser Nährflüssigkeit als Grundlage konnte in der einschlägigen Richtung nicht in einem einzigen Falle ein sicheres Ergebnis erzielt werden. Immerhin verdient festgehalten zu werden, daß bei kräftiger Indolbildung auch in dieser Versuchsanordnung bejahende Ergebnisse erzielt wurden. Trotz dieser Erfolge scheint aber die Paradimethylamidobenzaldehydlösung in der von Kovács angegebenen Zusammensetzung nicht die ihr nachgerühmten Fähigkeiten zu besitzen, denn gerade der sichere Nachweis gebildeten Indols bei nur schwach indolbildenden Stämmen ist für die Zwecke des täglichen Bedarfes von ausschlaggebender Bedeutung. Eine Ueberlegenheit gegenüber anderen Prüfungsverfahren, insonderheit dem nach Zipfel, kann somit dem Verfahren nach Kovács weder bei der Verwendung besonderer Indolnährböden (Tryptophan) noch bei der Verwendung gewöhnlicher Fleischbrühe zuerkannt werden. Nach dem ungünstigen Ausfalle der Versuche mit gewöhnlicher Fleischbrühe habe ich weitere Prüfungen in anderen Nährböden — ich dachte z. B. an die Milhzucker- oder Traubenzuckerfleischbrühe der bunten Reihe — als von vornherein aussichtslos fallen lassen. Der aus bestimmten anderen Gesichtspunkten notwendige Zusatz der Kohlehydrate dürfte eine stärkere Indolbildung nicht im Gefolge haben, sondern nach den Angaben in einschlägigen Lehrbüchern eher den gegenteiligen Erfolg zeitigen.

Zusammenfassung.

Mit dem neuerdings bekannt gegebenen Verfahren nach Kovács gelingt zwar der Nachweis von Indol bei kräftigen Indolbildnern sowohl in besonderen Nährböden wie auch in gewöhnlicher Fleischbrühe, jedoch gelingt es mit diesem Verfahren nicht, bei schwachen Indolbildnern weder in dem einen noch in dem anderen Nährboden ein sicheres und ausgeprägtes Ergebnis zu erzielen. Die dem Verfahren besonders nachgerühmte Ueberlegenheit, Indol auch in gewöhnlicher Fleischbrühe nachzuweisen, kommt ihm nicht in jedem Falle zu. Somit entsteht aus der vermeintlichen vorteilhaften Vereinfachung nur Unsicherheit.

Schrifttum.

- Kovács, Sitzungsber. d. Wiener Gesellsch. f. Mikrobiol. über die Tagung vom 25. 11. 1927. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 88. 1928. S. 430. — Zipfel, ebenda. Abt. I. Orig. Bd. 64. S. 65. — Abel-Olsen, Bakt. Taschenbuch. Leipzig, Curt Kabitzsch, 1925. — Titze u. Weichel, Arb. a. d. kaiserl. Gesundheitsamte, Bd. 33. 1910, B. T. W. 1908. S. 457. — Standfuß u. Lehr, B. T. W. 1928. (im Druck). — Gotschlich, Allg. Morph. u. Biol. d. path. Mikroorg., i. Handb. d. path. Mikroorganismen v. Kolle-Kraus-Uhlenhuth, Bd. 1. 1927.

Nachdruck verboten.

Bacterium Coli im Wirkungsgebiet alkalibildender Mikroben.

[Aus dem Mikrobiologischen Forschungsinstitut des Volksunterrichtskommissariats R. S. F. S. R. und dem Bakteriologischen Institut der II. Universität in Moskau (Direktor: Prof. I. Kritschewski).]

Von **S. Golikova.**

Die vorliegende Arbeit behandelt die Frage über die eigenartigen Veränderungen des *B. coli commune*, welche sekundäre Veränderungen der gefärbten Nährböden, die zur Differentialdiagnose der Coli-Typhusgruppe benutzt werden, nach sich ziehen.

Diese Frage wurde zuerst von zwei deutschen Autoren, Chiari und Loeffler, aufgeworfen, welche eine Erscheinung beschrieben, die wohl schon von Hunderten von Bakteriologen gesehen, aber nicht beachtet worden war: bei Massenuntersuchungen der Darmflora mit Aussaat der Fäzes auf Endo- oder Drigalski-Conradi-Nährboden kann man häufig beobachten, daß nicht alle Petri-Schalen, deren Inhalt sich anfangs dank der reichlichen Entwicklung der *B. coli commun.* durchweg rot färbt, ihr ursprüngliches Aussehen beibehalten; unter 10—15 Schalen finden sich immer 2—3, welche die Neigung zeigen, ihre Farbe zu ändern, und zwar sich auf Endo-Nährboden zu entfärben, auf Drigalski-Conradi blau zu färben. Nach Chiari und Loeffler, welche mit Endo-Nährboden arbeiteten, entsteht an den Stellen, wo sich die Kolonien am reichlichsten entwickelt haben, auf der leuchtend roten Petri-Schale eine Aufhellung, die sich in eine weiße Insel umwandelt; diese Insel vergrößert sich allmählich und ergreift immer größere Bezirke, bis schließlich alle Spuren des Fuchsin verschwunden sind und der ganze Agar in der Schale farblos geworden ist; er bleibt weiß bis zu seiner völligen Vernichtung durch Austrocknen.

Die Autoren nannten die Erscheinung „weiße Flecke“.

Führt man ein Stückchen Agar aus einem weißen Fleck auf eine rote Petri-Schale über, so ruft es hier Aufhellung hervor. Auf diese Weise stellten die Autoren die Tatsache fest, daß sich die weißen Flecken überimpfen lassen und die Fähigkeit haben Passagen zu geben. Die Autoren betonen, daß sich nur an den Stellen des roten Endo-Coli-Agars sekundäre weiße Flecken bilden, wo lebende Kolonien des *B. coli* vorhanden sind. Wenn das übergeimpfte Stückchen aus dem weißen Fleck in seiner Nähe keine lebenden Bakterien findet, so wird es selbst rot; auch wenn das Stückchen auf unbesätes Agar übergeführt wird, färbt es sich rot.

Daß notwendig eine lebende Kultur vorhanden sein muß, um das Phänomen der Entfärbung hervorzurufen, veranlaßt die Autoren diese Erscheinung dem d'Herelleschen Phänomen an die Seite zu stellen.

Nachdem Chiari und Loeffler den Mechanismus des Zustandekommens und der Entwicklung der weißen Flecken klar gestellt hatten, stellten sie eine Theorie über die Natur dieses Phänomens auf.

Ausgehend von der experimentell bewiesenen Tatsache, daß die Weißfärbung des roten Endo-Coli-Agars von der Steigerung der Alkalität des Nährboden abhängt, nehmen die Autoren folgendes an: es gibt Stämme des *B. coli* (*B. coli alcaligenes* oder weiße Stämme des *B. coli*), welche ein alkaligenes aerophiles Ferment enthalten. Da sie in ihrem Körper dieses Ferment enthalten, produzieren sie nicht nur selbst Alkalien, sondern regen auch die benachbarten Kolonien des *B. coli* zu gleicher Produktion an, da letztere das gleiche Ferment in latenter Form enthalten, das bei Berührung mit Alkalien seinerseits zur Tätigkeit angeregt wird. Die in der neuen Gruppe gebildeten Alkalien machen das Ferment der nächsten Gruppe frei usw. Dadurch erklärt sich das Wachsen der weißen Flecken.

Biochemisch ausgedrückt, muß diese Erscheinung augenscheinlich folgendermaßen definiert werden: der bakterielle Körper enthält ein Proferment, welches durch Alkalien aktiviert wird.

Da mich die Natur der weißen Flecken interessierte, beschloß ich, das Experiment der Autoren zu wiederholen.

Das Material, mit dem ich begann, bestand in den Schalen, die von den praktischen Uebungen der Studenten, welche die Coli-Typhusgruppe mit

Aussaat von *B. coli* auf Endo-Nährboden studierten, übriggeblieben waren. Unter 250 Schalen, die eine Woche alt waren, fanden sich etwa 20 mehr oder weniger entfärbte Schalen, mit denen ich meine Arbeiten begann.

Die meisten Versuche ergaben Resultate, welche mit denen Chiari und Löfflers vollkommen übereinstimmten, daher führe ich sie hier nicht an. Ich bringe hier nur die Versuche, in welchen ich von den deutschen Autoren abweichende Ergebnisse erhielt.

Ich variierte die Versuche bezüglich der Wechselwirkung des roten Endo-Coli-Agars und des Agars der weißen Flecken nach dem Schema von Chiari und Loeffler und fand dabei, daß es durchaus nicht gleichgültig ist, in welchem Verhältnis zu einander diese Kulturen zu liegen kommen, und zwar, daß das Phänomen schneller und vollständiger zustande kommt, wenn die Kulturen nicht in unmittelbare Berührung miteinander kommen. Legt man Stücke des roten Endo-Coli-Agars mit der Kolonie nach oben auf den weißen Fleck, so entfärben sie sich schnell und vollständig, legt man sie mit den Kolonien nach unten, so ist die Entfärbung häufig nicht vollständig. Führt man dagegen ein Stück des weißen Fleckes mit der Kolonie nach oben auf eine rote Schale über, so entfärbt es schnell den darunter liegenden Bezirk, der sich allmählich mehr und mehr ausbreitet, bis die ganze Schale entfärbt ist; kommt das Stück des weißen Fleckes mit der Kolonie nach unten zu liegen, so entsteht vielleicht während der ersten Stunden eine leichte Aufhellung, die jedoch bald verschwindet worauf das weiße Stückchen selbst leuchtend rot wird.

Nach Ansicht der deutschen Autoren spielen diese Wechselbeziehungen keine Rolle, da das Resultat in beiden Fällen das gleiche ist.

Ebenso konnte ich ihre Angaben über die Bedeutung einer Spalte im Nährboden, die wie eine Barriere die Ausbreitung des weißen Fleckes verhindern soll, nicht bestätigen. Ich hatte mehrfach Gelegenheit, das Ueberschreiten einer Spalte durch den weißen Fleck zu beobachten.

Diese Tatsachen legen den Gedanken nahe, daß die Kolonien der weißen Flecken flüchtige, gasartige Alkalien ausscheiden. Diese Annahme bildete den Ausgangspunkt für meine weiteren Versuche. Sollte diese Annahme richtig sein, so müßte eine Entfärbung nicht nur durch Kontakt zustande kommen, wie bei den deutschen Autoren, sondern auch, wenn das entfärbende Agens und die Kultur, auf welche sie einwirken soll, von einander getrennt sind, aber die letztere sich in der Atmosphäre der ersteren befindet.

Die Annahme flüchtiger Alkalien erwies sich als richtig, da ein Lakmuspapier sich in der Atmosphäre einer weiß gewordenen Schale blau färbte, und natürlicherweise trat auch das Phänomen der Entfärbung bei nicht in Berührung stehenden roten und weißen Kulturen ein.

Die Versuche wurden folgendermaßen angeordnet:

1) Es wird ein Würfel aus dem Agar mit dem weißen Fleck herausgeschnitten und aus der Schale entfernt. An seine Stelle wird ein kleinerer Würfel roten Agars gesetzt, und zwar so, daß sich die Kulturen nicht berühren, sondern durch einen Spalt getrennt sind. Der rote Würfel wird völlig entfärbt.

2) Auf die weißen Flecken wurden vorher sterilisierte Deckgläser, Objektträger oder Uhrgläser mit darauf liegenden Stücken roten Endo-Coli-Agars gelegt. Letztere erwiesen sich nach längerer oder kürzerer Zeit als entfärbt. Im Thermostaten kommt das Phänomen schnell zustande (1—2 Std.), bei Zimmertemperatur sehr viel langsamer (12—15 Std.).

3) Der nächste Versuch, der sich logisch auf den vorhergehenden aufbaute, bestand darin, daß das Entfärbungsphänomen durch Fernwirkung auf dem Wege der Induktion hervorgerufen werden sollte. Zu diesem Zwecke wurden Stücke des roten Endo-Coli-Agars auf den Deckel einer Schale mit weißem

Fleck, welcher den ganzen Inhalt der Schale entfärbt hatte, gelegt. Nach einigen Stunden verloren die Stücke roten Agars ihre Farbe und gewannen sie auch nach Entfernung aus dem Wirkungsgebiet des entfärbenden Agens nicht wieder. Zur Kontrolle wurden Stücke der roten Coli-Kultur auf den Deckel einer unbesäten Schale mit Endo-Agar gelegt, sie veränderten ihr ursprüngliches Aussehen nicht.

Ferner war von Interesse, festzustellen, wie sich Kulturen, welche den Endo-Nährboden nicht verändern, aber weiße Kolonien bilden, unter analogen Bedingungen zu roten Endo-Coli-Agar verhalten. Mit Hilfe von Kulturen aus der Coli-Typhusgruppe, welche die Laktose nicht verändern und auf Endo-Nährboden weiße Kolonien geben, erhielt schon Loeffler, nach der in seiner Arbeit ausführlich dargelegte Methode, weiße Flecken; ich wiederholte seine Experimente nicht, sondern versuchte das Phänomen mit Hilfe „weißer“ Kulturen (solcher Kulturen, die auf Endo-Nährboden weiße Kolonien geben) durch die Induktionsmethode zu erzielen. Außer den Bakterien der Coli-Typhusgruppe (*B. Eberth*, *B. dysenteriae* Shiga-Kruse, *B. paratyphi* A und B, *B. Gärtner*) zog ich zu den Versuchen noch *B. pyocyaneus*, *B. proteus vulgaris*, *B. faecalis alcaligenes* und einige andere, die flüchtige Alkalien in großer Menge ausscheiden, hinzu. Die Bakterien der Coli-Typhusgruppe verhielten sich beim Entfärbungsversuch durch Fernwirkung ebenso, wie die weißen Flecken: sie brachten eine Entfärbung zustande, die aber recht langsam fortschritt. Durch die Kulturen energischer Alkalibildner (*B. pyocyaneus*, *B. faecalis alcaligenes*) wurde der rote Endo-Coli-Agar im Thermostaten auf Entfernung in 25–40 Min. entfärbt.

Variationen des Versuches zeigten bei der Entwicklung des Phänomens nur Abweichungen in der Zeit, das Resultat blieb aber stets das gleiche, d. h. Entfärbung der roten Kultur des *B. coli commun.* auf Endo-Nährboden, wenn diese Kultur in die Atmosphäre der Alkalibildner gebracht wird.

Legt man ein Stück roten Endo-Coli-Agars auf den Deckel einer Schale, in welcher eben eine alkalibildende Kultur ausgesät worden ist, so geht die Entfärbung langsam vor sich, entsprechend dem Wachstum der Kultur.

Sät man auf einer Schale mit Endo-Agar *B. coli commun.* und auf einer anderen Schale *B. pyocyaneus* oder *B. faecalis alcaligenes* und stürzt die eine Schale über die andere, so verändert *B. coli commun.* anfangs den Nährboden und wächst in Form von roten Kolonien; letztere verlieren aber schnell ihre Farbe, sobald die alkalibildende Kultur sich genügend entwickelt hat.

Der durch Induktion auf Entfernung entfärbte Endo-Coli-Agar kann seinerseits wieder weiße Flecken hervorrufen. Diese Tatsache ist von besonderem Interesse und bestätigt, wie mir scheint, die Theorie der deutschen Autoren, daß die Bakterienzelle ein in latentem Zustande befindliches Ferment enthält, welches durch die Berührung mit Alkalien aktiviert wird. Wenn der rote Endo-Coli-Agar sich auf Entfernung nur dank der Imprägnierung mit flüchtigen Alkalien entfärben würde, so müßte er wieder rot werden, sobald er aus der alkalischen Atmosphäre entfernt wird; nimmt man jedoch an, daß die Alkalien das in den Bakterien enthaltene Proferment aktiviert haben, so erklären sich hierdurch die Erscheinungen, daß die durch Induktion entfärbten Kulturen des *B. coli* weiß bleiben, auch wenn sie aus dem Wirkungsgebiet des entfärbenden Agens entfernt werden, und daß das Phänomen auf neuen Schalen zustande kommt, wenn man diese Kulturen auf dieselben überträgt.

Um sekundäre weiße Flecken zu erhalten, benutzte ich die Methode von Chiari und Loeffler: Schalen mit Endo-Agar, dessen pH gleich 7,6 war (die nach Ansicht der Autoren für das Entfärbungsphänomen günstigste Konzentration der Wasserstoffionen) wurden dicht mit einer Kultur des *B. coli com-*

mune besät, ein entfärbtes Stück Endo-Coli-Agars, welches 2—5 Tage auf dem Deckel einer irgendeine „weiße“ Kultur enthaltenden Schale gelegen hatte, wurde auf die Aussaat gelegt. Nach 12—15 Std. erschien auf der leuchtend roten Schale ein scharf umrissener weißer Fleck, der genau die Form des aufgelegten Stückes hatte. Dieser Fleck verhielt sich ebenso, wie die von Chiari und Loeffler beschriebenen, d. h. er entfärbte erstens allmählich den ganzen Inhalt der Schale und gab zweitens bei Ueberimpfung von Schale zu Schale Passagen.

Will man mit Hilfe von durch Induktion entfärbtem Agar weiße Flecke erzielen, so ist es durchaus nicht gleichgültig, durch welche Kultur die Induktion ausgeführt wurde. Endo-Coli-Agar, der durch eine Kultur entfärbt wurde, von welcher eine bestimmte Menge in einer Zeiteinheit eine große Menge Alkali bildet, die nach dem pH des Nährbodens berechnet wird, ruft sekundäre weiße Flecken hervor, die man immer passieren lassen kann. Agar z. B., der durch eine Kultur von *B. pyocyaneus* oder *B. faecalis alcaligenes* entfärbt wurde, gibt eine Menge Passagen. Agar jedoch, der durch Typhus-, Paratyphus- oder Dysenteriekulturen entfärbt wurde, kann wohl einen weißen Fleck hervorrufen, gibt jedoch keine Passagen.

Bei der Bestimmung der Alkalimenge, die von diesen Kulturen ausgeschieden wird, ergab sich folgendes:

In einer Bouillon, deren pH 6,8 beträgt,

gab <i>B. pyocyaneus</i>	nach 12 Std. pH 7,6
<i>B. faecalis alcaligenes</i>	„ „ „ „ 7,7
<i>B. typhi abdominalis</i>	„ „ „ „ 7,0
<i>B. dysent. Shiga-Kruse</i>	„ „ „ „ 7,1
<i>B. paratyphi A</i>	„ „ „ „ 7,0

Benutzt man zu den Versuchen den Drigalski-Conradi-Nährboden mit der gleichen Konzentration der Wasserstoffione, so entstehen in der gleichen Zeit größere blaue Zonen, als die weißen Flecken auf Endo-Agar. Die blauen Zonen können durch die gleichen Methoden hervorgerufen werden, wie die weißen Flecken, d. h. per continuitatem nach Chiari-Loeffler und nach der von mir beschriebenen Methode der Induktion. Stücke des roten Coli-Agar Drigalski-Conradi, die nach einer der genannten Methoden blau gefärbt wurden, geben Passagen, die ad infinitum wiederholt werden können.

Kulturen, welche flüchtige Alkalien ausscheiden, sogenannte „weiße“ Kulturen, üben auch auf unbesäten Endo-Agar einen eigenartigen Einfluß aus, der sich bei nachfolgender Aussaat von *B. coli commune* bemerkbar macht. Die Schale mit unbesättem Endo-Agar wird auf 3—6—12—15 Std. über eine Schale mit einer der stark alkalibildenden Kulturen gestülpt und danach mit *B. coli commune* besät. Auf den Schalen, die dem Einfluß der Alkalibildner für 5—6 Std. ausgesetzt wurden, bilden sich charakteristische weiße Flecken mit scharf umrissenen, eigenartige Formen bildenden Rändern. Nach einer 3stünd. Beeinflussung erscheinen auf der roten Schale kaum merkliche kleine Aufhellungszonen: nach 12—15stünd. Beeinflussung wächst die Coli-Kultur fast ganz weiß mit schmalen rotem Rand.

Es ist anzunehmen, daß im gegebenen Fall eine Imprägnierung des Agars mit den flüchtigen Alkalien zustande kommt, welche die gleich nach Entfernung der beiden Schalen von einander ausgesäten Coli-Bakterien aktiviert, aber nicht lange anhält: wird die Aussaat erst 3—5 Std. nach der Entfernung des Agars aus dem Wirkungsgebiet des Alkalibildners vorgenommen, so erhält man eine gleichmäßig rote Kultur.

Auch unter dem Einfluß von Ammoniak verändert sich der Agar: man gibt 2—3 Tropfen Ammoniak auf ein Stück Filtrierpapier und legt dieses für 1—2 Std. auf den Deckel einer unbesäten, Endo-Agar enthaltenden Schale. Darauf wird das Filtrierpapier entfernt und *B. coli commune* ausgesät. Die Kultur wächst weiß mit kleinen rosa Bezirken; es gelingt jedoch auf diese Weise nicht, die charakteristischen weißen Flecken mit ihren scharfen Grenzen und ihrer eigenartigen Form zu erzielen.

Die letzte Frage, die durch die Versuche beantwortet werden sollte, betrifft den Einfluß abgetöteter Kulturen auf das Entfärbungsphänomen.

In seiner zweiten Arbeit erwähnt Loeffler einen Versuch mit abgetöteten Kulturen. Er vermischte geschmolzenen Endo-Agar zum Teil mit einer Emulsion lebender *B. typhi abdom.*, zum Teil mit toten Bakterien und säte dann auf den abgekühlten Agar *B. coli* aus. Auf dem Agar mit lebenden Bakterien erhielt Loeffler weiße Kolonien des *B. coli*, auf dem Agar mit toten Bakterien — rote Kolonien. Hieraus zieht er den Schluß, daß nur lebende Bakterien das Entfärbungsphänomen hervorrufen können, tote aber nicht, da sie inaktiv geworden sind.

Ich ordnete meine Versuche mit toten Kulturen anders an, und meine Resultate stimmten mit denen Loefflers nicht überein.

Gestützt auf die Annahme von Chiari und Loeffler, daß die Entfärbung durch ein Ferment, welches Alkali absondert, hervorgerufen wird, bemühte ich mich, die Wirkung des Ferments von der lebenden bakteriellen Zelle zu trennen. Wir wissen, daß einige Fermente eine Erwärmung bis 100° und mehr vertragen, ferner, daß chemische Substanzen, wie Chloroform, die Bakterien töten, die Fermente aber nicht zerstören. Mir lag daran, klarzustellen, ob dieses alkalibildende Agens aktiv bleibt, auch wenn die dasselbe ausscheidende Kultur abgetötet wird. Mir schien, daß ein positives Resultat ein wichtiger Beweis für die fermentative Natur des Entfärbungsphänomens sei.

Ich versuchte die Kultur zu kochen und auch sie mit Chloroform zu bearbeiten.

Der Kochversuch wurde folgendermaßen angeordnet: die Agarkultur eines Alkalibildners, die häufig recht alt war, aber ein in das Probiergläschen eingeführtes rotes Lackmuspapier blau färbte, wurde mehrere Minuten lang gekocht; eine Probe hiervon wurde zur Kontrolle der Sterilität ausgesät. Der durchgekochte Agar mit der Kultur wurde in eine Petri-Schale ausgegossen, abgekühlt und getrocknet, auf dasselbe wurde dann ein Stück roten Endo-Coli-Agars gelegt; dieser entfärbte sich.

Die Anordnung der Versuche mit Beeinflussung durch Chloroform war folgende: Dem Einfluß des Chloroforms wurde eine ganze Reihe von Schalen mit verschiedenen Kulturen ausgesetzt: mit „weißen“ Kulturen, mit rotem Endo-Coli-Agar, mit rotem Endo-Coli-Agar, auf dem sich weiße Flecken gebildet hatten, mit durch weiße Flecken völlig entfärbtem Agar. Das Fehlen der Lebensfähigkeit der Kulturen wurde durch Aussaat nachgeprüft.

Die Versuche gaben folgende Resultate:

Auf den roten Schalen mit weißen Flecken nahmen letztere unter dem Einfluß der Chloroformdämpfe zu, es kam aber nicht zu völliger Entfärbung des ganzen Inhalts der Schale. Meist erweiterte sich der weiße Fleck um 1½—2 cm, worauf die Entfärbung stehen blieb.

Rote Stücke einer getöteten *B. coli*-Kultur entfärben sich auf lebenden, wie auf toten weißen Kulturen, wobei kleine Stücke auf diesen, wie auf jenen farblos bleiben, während mit großen Stücken eine Reihe interessanter Veränderungen vor sich geht, je nachdem, ob sie auf eine lebende oder auf eine tote Kultur gelegt worden sind.

Auf einer toten weißen Kultur entfärben sie sich nicht bis zum völligen Schwinden des Farbstoffes, sondern bleiben blaß rosa und werden nach 25—30 Std. wieder leuchtend rot, wobei das Fuchsin in den darunterliegenden Nährboden zu diffundieren beginnt.

Auf einer lebenden weißen Kultur entfärbt sich ein Stück toten roten Agars auch nicht vollständig, sondern wird während der ersten Stunden rosa, um sich nach 12—15 Std. wieder rot zu färben. In dem Maße, wie sich die Kultur wieder rot färbt, zeigt die weiße Kultur in ihrer Umgebung verstärktes Wachstum und umgibt sie mit einem Saum neugebildeter Kolonien. Unter dem Einfluß dieser Kolonien erneut sich die Entfärbung und schreitet bis zum völligen Verschwinden des Farbstoffes fort. Welcher Bestandteil des roten Stückes der abgetöteten Kultur verstärktes Wachstum der dasselbe umgebenden Teile der weißen Kultur stimuliert, muß durch weitere Forschung auf diesem Gebiete klargestellt werden.

Durch Chloroform abgetötete weiße Kulturen entfärben daraufgelegte Stücke einer roten lebenden Kultur, welche ihr Aussehn danach nicht mehr verändern.

Stücke eines weißen Fleckes mit lebender Kultur bleiben weiß, wenn sie auf eine Schale mit abgetöteter weißer Kultur gelegt werden, verhalten sich in diesem Falle also anders, als wenn sie auf eine Schale mit unbesätem Agar gelegt werden: hier werden sie, wie oben erwähnt wurde, schnell rot.

Schließlich mußte noch klargestellt werden, wie ein chemischer Stoff, welcher nicht nur die lebende Zelle tötet, sondern auch das Ferment lähmt, auf die Entstehung und Entwicklung der weißen Flecke einwirkt. Zu diesem Zwecke benutzte ich Jod. Eine Schale mit großem weißem Fleck, dessen Grenzen vorher angemerkt worden waren, wurde mit Joddämpfen gesättigt, dabei erwies sich, daß die Entfärbung unter dem Einfluß des Jod sofort aufhörte, und daß sich der weiße Fleck nicht um einen Millimeter mehr vergrößert hatte. Durch den Paralysator der Fermente wird der Wirkung des entfärbenden Agens sofort Einhalt getan.

Der Versuch mit Jod wurde noch in anderer Anordnung vorgenommen.

Längs der Grenze des weißen Fleckes wurde mit Jodtinktur ein dicker Strich gezogen. Die Entfärbung hörte sofort auf, setzte aber wieder ein, nachdem sich das Jod völlig verflüchtigt hatte (ungefähr nach 2 Tagen). Der tote Streifen, der mit Jodtinktur bestrichen worden war, und der beim Ueberimpfen keine Bakterienkolonie gab, spielte im gegebenen Falle die Rolle einer Spalte, über welche die Entfärbung, entsprechend meinen früheren Erfahrungen, hinwegschritt.

Dieses sind die Ergebnisse, welche ich beim Studium des Entfärbungsphänomens bisher erhalten habe.

Meine weitere Arbeit soll in der Untersuchung des Chemismus dieses Phänomens und seiner Beziehungen zum d'Herelleschen Phänomen bestehen.

Auf Grund der erhaltenen Ergebnisse ziehe ich folgende Schlüsse:

1. Die fermentative Natur des alkalibildenden Agens, welches auf rotem Endo-Coli-Agar weiße Flecken hervorruft, die von Chiari und Loeffler beschrieben wurden, bestätigte sich. — 2) Das Vorhandensein eines Proferments im Zellkörper des *B. coli commune*, welches unter dem Einfluß von Alkali in aktives alkalibildendes Ferment umgewandelt wird, konnte gleichfalls bestätigt werden. — 3) Dieses Ferment bildet flüchtige Alkalien, welche das Phänomen der Entfärbung von rotem Endo-Coli-Agar nicht nur per con-

tinuitatem, sondern auch durch Fernwirkung auf dem Wege der Induktion hervorrufen. — 4) Die durch Induktion entfärbten Kulturen erhalten ihre Farbe nicht wieder, auch wenn sie aus der Atmosphäre des Alkalibildners entfernt werden. — 5) Die durch Induktion entfärbten Kulturen können sekundäre weiße Flecke hervorrufen. — 6) Das Auftreten des Entfärbungsphänomens ist nicht an eine lebende Kultur gebunden.

Literatur.

1) Chiari und Loeffler, Ueber ein übertragbares alkalibildendes Agens gewisser Coli-Stämme. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 96. 1925. S. 95. — 2) Loeffler, Weitere Untersuchungen über das übertragbare alkalibildende Agens in der Coli-Gruppe. (Ebenda. S. 398).

Nachdruck verboten.

Eine neue Variante von Paratyphus B Schottmüller.

[Aus dem Bakteriologischen Institut der Universität Sendai (Direktor Prof. K. Aoki).]

Von Dr. Y. Tazawa.

Wie schon von Aoki und seinen Schülern angegeben, sind Stämme der Paratyphus B-Bazillen und Mäusetyphusbazillen aus 3 Varianten zusammengesetzt. Sie wurden von ihm die spezifische, unspezifische und gemischte Form genannt, weil die 1. nur im Serum aus eigenem Typus, die 2. nicht nur in denen aus dem eigenen Typus, sondern auch in den unspezifischen Seren aus den anderen Typen sehr stark und die 3. Form ebenso reagierte. Jedoch wurden die 2 letzteren in dem spezifischen Serum aus den anderen Typen nicht beeinflusst. Einzelne wurden noch nicht als selbständiger Stamm nachgewiesen. Durch die Untersuchungen von Takayanagi wurde festgestellt, daß die Verteilung dieser 3 Formen je nach den Stämmen so verschieden auftritt, daß bei einem Stamm diese 3 Formen komplett nachgewiesen wurden, bei anderen aber inkomplett, wie die spezifische und unspezifische oder die unspezifische und gemischte.

Ausnahmsweise wurde die gemischte Form ab und zu als selbständiger Stamm nachgewiesen. Die sogenannten spezifischen Stämme vom Typ. PB 37 und Ms. 34, über die Aoki, Sakai und andere schon berichtet haben, sind jedoch keine Stämme, welche von Natur aus nur spezifische Varianten enthalten. Wenn sie analytisch genau betrachtet werden, so stellen sie diejenigen gemischten Stämme dar, welche immer dazu neigen, vorwiegend eine spezifische Form abzugeben, wie wir schon öfters beobachtet haben. Der Paratyphus B-Stamm, welcher von Takayanagi als ein besonderer Stamm nachgewiesen worden ist, stellte gleichfalls denjenigen Stamm von Paratyphus B-Bazillen dar, welche immer dazu neigen, vorwiegend die unspezifische Form abzugeben. Um mit seiner spezifischen Form der Kultur zu arbeiten, müssen die betreffenden Stämme immer frisch in Kolonien zerlegt werden. Von diesen isolierten Kolonien müssen sie als reine Form ausgewählt werden. Bis jetzt wurden noch keine Stämme gefunden, welche nur eine Variante enthalten. Doch wurde kürzlich unter den Stämmen von Paratyphus B-Bazillen zufällig einer nachgewiesen, welcher als reine unspezifische Form betrachtet werden mußte. Nach dem Verzeichnis der Sammlung des Lister-Instituts wurde er als Mucoid Paratyphosus B-

Doch wurden niemals Kolonien nachgewiesen, welche in spezifischen Seren reagierten. Deshalb muß angenommen werden, daß der Stamm PB Typ, welcher vom Lister-Institute bezogen war, eine Form darstellt, welche unspezifisch wirkt. Diese unspezifische Form scheint so fixiert zu sein, daß sie nicht befähigt ist, die spezifische Form der Kolonien abzugeben. Um diese Ausnahme noch sicherer nachzuweisen, wurden von anderer Seite Versuche mit Kaninchen angestellt, die mit diesem Stamm immunisiert wurden. Falls der Stamm spezifische Komponenten in sich enthält, muß der Tierkörper dagegen so reagieren, daß spezifisches Agglutinin neu gebildet wird. Zu diesem Zwecke wurden 2 Kaninchen mit 2 Kulturen vorbehandelt, wie bei uns immunisiert zu werden pflegt. Die eine Kultur stellte die originale und die 2. die isolierte dar. Um irgendeine spezifische Form von Agglutinin in diesen Seren nachzuweisen, wurden die neu hergestellten Seren den repräsentierenden Stämmen aus den einzelnen Typen gegenüber agglutinatorisch untersucht. Die Stämme waren folgende: Typus PB, Ms, PAI, Hogcholera, Newport, L, Stanley und typhi. Die einzelnen Typen bestanden aus der spezifischen und unspezifischen Form. Dabei wurde festgestellt, daß die beiden Seren sich zueinander gang gleich verhalten. Sie agglutinierten nämlich keine spezifische Form aus sämtlichen Typen, die unspezifische Form dagegen bei vielen Typen sehr stark, und zwar besonders stark bei den Typen PB, Ms, Newport und Stanley, so daß sie darin bis zum Titer agglutinierten. Diese Ergebnisse der Agglutininbildung der angestellten Versuche stimmten ganz genau mit den bei den früher bei Agglutinationsversuchen gemachten überein (Tab. III). Durch diese von 2 Seiten

Tabelle III.

Name der Bakterien		Name d. Immunsera			Name der Bakterien		Name d. Immunsera		
		L. 5	L. 5a	L. 5b			L. 5	L. 5a	L. 5b
		Titer					Titer		
		20 000	10 000	100—			20 000	10 000	100—
Ty	{ sp. unsp.	100— 1000±	100— 2000	100— 100—	Hogcholera	{ sp. unsp.	100— 2000	100— 2000	100— 100—
PB	{ sp. unsp.	100— 10 000	100— 20 000	100— 100—	Newport	{ sp. unsp.	100— 10 000	100— 20 000	100— 100—
Ms	{ sp. unsp.	100— 10 000	100— 20 000	100— 100—	L.	{ sp. unsp.	200 2000	200 2000	100— 100—
P A I	{ sp. unsp.	100— 500	100— 500	100— 100—	Stanley	{ sp. unsp.	100— 10 000	100— 20 000	100— 100—

unternommenen Untersuchungen ist demnach sicher nachgewiesen, daß der Stamm PB-Thjotta ein solcher ist, welcher die Fähigkeit, spezifische Kolonien abzugeben, verloren hat. Später wurde er absorptorisch untersucht, und zwar zunächst daraufhin, ob er das unspezifische Agglutinin von Typhus, PB, Ms, Newport und Stanley gut absorbieren kann. Zu diesem Zwecke wurden vorsichtig hergestellte unspezifische Seren aus den Typen PB, Ms, Newport und Stanley ausgewählt und ihnen dann Kulturen, welche sowohl aus originaler als auch aus isolierter Kultur hergestellt waren, hinzugesetzt und eine gewisse Zeit gesättigt. Nach Abtrennung der Bakterien wirkten die Seren nicht nur in der homologen Kultur, sondern auch in der heterologen gar nicht mehr. Es muß deshalb angenommen werden, daß der Stamm mit dem unspezifischen Teil von PB, Ms, Newport und Stanley ganz identisch ist (Tab. IV). Umgekehrt wurde untersucht, ob das Agglutinin, welches früher mit unserem Stamm bei

Tabelle IV.

Name der Bakterien		Name der Immunsera					
		PB		Ms		Newport	
		gemischt	unsp.	gemischt	unsp.	gemischt	unsp.
		absorbiert mit					
		L. 5					
L. 5		—	—	—	—	—	—
PB	{ sp.	+	—	—	—	—	—
	{ unsp.	—	—	—	—	—	—
Ms	{ sp.	—	—	+	—	—	—
	{ unsp.	—	—	—	—	—	—
Newport	{ sp.	—	—	—	—	+	—
	{ unsp.	—	—	—	—	—	—

Kaninchen hergestellt worden war, von der unspezifischen Kultur des Typus PB, Ms, Newport und Stanley gesättigt wird. Dazu wurden die Seren mit Kultur der unspezifischen Form des Typus PB, Ms, Newport und Stanley gesättigt. In diesen Seren wurde sowohl die originale als auch die unspezifische Kultur der oben genannten Typen agglutinatorisch untersucht. Dabei ergab sich, daß die homologe Kultur darin ebenso schlecht, wie die heterologe agglutinierte (Tab. V). Durch obige 2 Absorptionsversuche wurde also nachgewiesen, daß

Tabelle V.

Name der Bakterien		Name der Immunsera															
		L. 5						L. 5a									
		PB		Ms		Newport		Stanley		PB		Ms		Newport		Stanley	
		absorbiert mit															
		gemischt	unsp.	gemischt	unsp.	gemischt	unsp.	gemischt	unsp.	gemischt	unsp.	gemischt	unsp.	gemischt	unsp.	gemischt	unsp.
L. 5		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
PB	{ sp.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	{ unsp.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Ms	{ sp.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	{ unsp.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Newport	{ sp.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	{ unsp.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Stanley	{ sp.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	{ unsp.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	

der Stamm der Paratyphusbazillen, welcher vom Lister-Institut als Paratyphus B-Schottmüller-Thjotta bezeichnet worden war, als eine reine, unspezifische Form betrachtet werden muß, die auch im Typus PB, Ms, Newport und Stanley vorhanden ist. Wie Aoki bemerkt hat, zeigten die unspezifischen Formen des Typus PB, Ms und Newport unter anderem gegenseitig besonders starke Agglutination, so daß man sie voneinander manchmal kaum unterscheiden kann, falls sie dabei den eignen spezifischen Anteil nicht enthielten. Schon Aoki und Takayanagi hatten beobachtet, daß die unspezifischen

Teile des Typus PB und Ms gegenseitig so stark agglutinierten, daß man sie gegenseitig nicht unterscheiden kann. Auch absorptorisch kann man sie kaum unterscheiden, weil sie gegenseitig ebenso gut, wie in den homologen absorbiert wurden. Ich bin deshalb anzunehmen geneigt, daß unser Stamm einen unspezifischen Anteil des Typus PB-Schottmüller darstellt, welcher so selbständig geworden ist, daß er seine Fähigkeit, die spezifische Form von Kolonien abzugeben, total verloren hat.

Zusammenfassung.

1) Unter den Stämmen des Paratyphus B-Schottmüller, welche vom Lister-Institut in London uns zur Verfügung gestellt wurden, wurde ein Stamm PB nachgewiesen, welcher agglutinatorisch insofern von den anderen gewöhnlichen PB differenziert war, als er im spezifischen Serum des Typus PB gar nicht reagiert. — 2) In Serum, welches mit diesem Stamm bei Kaninchen hergestellt war, wurde spezifisch wirkendes Agglutinin nicht nachgewiesen. — 3) Infolgedessen muß angenommen werden, daß der Stamm eine unspezifische Form des Typus PB ist, welcher als reiner selbständiger Stamm vorkommt. Deshalb war kein spezifischer Anteil bei ihm nachweisbar. — 4) Dieser unspezifische Anteil scheint derselbe, wie der des Typus Ms, Newport und Stanley zu sein.

Literatur.

1) Aoki, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 98. 1926. S. 273. — 2) Ders., Ztschr. f. Immunitätsf. Bd. 50. 1927. S. 162. — 3) Aoki, Sakai u. Hayashi, Ebenda. Bd. 52. 1927. S. 384.

Nachdruck verboten.

Die Unterscheidung der Paratyphus B-, Enteritis- und Suipestiferbakterien, insbesondere mit Hilfe der Gelatineplatte.

[Aus dem Hygienisch-Bakteriologischen Institut der Universität Erlangen.]

Von Prof. Dr. **Ludwig Heim.**

Mit 1 Tafel.

Es ist kaum glaublich und schwer zu verstehen, daß so viele Forscher seit etwa 25 Jahren alle möglichen Züchtungsverfahren und mehr oder weniger umständliche serologische Prüfungen in ungezählten Versuchsreihen anwandten, um die Bakterien des Paratyphus B von den ihnen ähnlichen zu unterscheiden, und daß sie dabei das Gelatineplattenverfahren, das gerade für diesen Zweck besonders förderlich ist, ganz außer Betracht gelassen haben.

Bis in die neuere Zeit war es meines Wissens nur B. Fischer, der es dafür benutzt und darüber im Jahre 1902 unter Beigabe von Lichtbildern einiger Ansiedelungen der von ihm untersuchten Erreger der Rumflether Fleischvergiftung und des Bact. enteritidis Gärtner veröffentlicht hat. Neuerdings bezeichnete sogar ein gerade auf dem Gebiete der Nährbodenfrage bekannter Bakteriologe das Plattengußverfahren als „antiquiert“. Wie sehr er

im Unrecht ist und welchen Vorteil es bringt, wenn man das Rob. Kochsche Verfahren der Reinzüchtung gebraucht, soll die folgende Abhandlung über die Paratyphus- und die ihr nahestehende Enteritisgruppe dartun.

Daß es mit ihm leicht gelingt, Typhus- und Paratyphusbazillen als verschieden zu erkennen, habe ich bereits im Jahre 1919 (2) dargelegt und mit Lichtbildern belegt. Zwar kann man auch ohne es mit den anderen üblichen Verfahren zu einem richtigen Ergebnis kommen, aber die Gelatineplatte gibt allein schon binnen 2 Tagen bei nicht zu niedriger Zimmerwärme den gewünschten Aufschluß: Die Ansiedelungen der Typhusbazillen auf der Oberfläche sind zart und haben die sogenannte Weinblattform mit blätterrippenartiger Zeichnung, die der frisch aus dem Kranken gezüchteten Paratyphusbazillen dagegen bilden Kuppen, die, solange sie noch durchsichtig genug sind, bei schwacher Vergrößerung eine strahlen- und flammenförmige Zeichnung aufweisen. Ich habe im Felde auf Grund dieses Merkmals die mir vorgelegten Platten ohne vorherige Kenntnis des Ausfalls der übrigen Reihen mit durchgehendem Erfolge kontrolliert und dabei zugleich die Möglichkeit gehabt, die zur Schlußagglutination und als Beleg dienende Schrägagarkultur auf ihre Reinheit zu prüfen. Legt man die Gelatineplatte schon entsprechend früher an, dann hat man das Ergebnis zugleich mit der Abgabe des endgültigen Befundes, vorausgesetzt, daß die Wärme der Umgebung nicht zu niedrig oder zu hoch war.

Waren auch die anderen bisher gebräuchlichen Verfahren völlig ausreichend, um zwischen Typhus- und Paratyphusbazillen zu unterscheiden, so gelang dies nicht so leicht und sicher zwischen Paratyphus- und Enteritisbakterien, wie schon daraus hervorgeht, daß noch jetzt Meinungsverschiedenheiten bestehen, ob beide mit Sicherheit auseinander gehalten werden können. Nun hatte man namentlich in der Wallbildung auf der Agarplatte ein gutes Unterscheidungsmittel; immerhin drängte sich die Frage auf, ob man mit der Gelatineplatte nicht noch genauere Aufschlüsse erhalten könne. Knorr, der auf meine Anregung hin seit dem Jahre 1920 in unserer Untersuchungsanstalt darauf bedacht war, konnte bald feststellen, daß außer den Kuppenformen Stämme mit sogenannten Weinblattformen vorkamen, und daß diese von Fällen akuter Enteritis herrührten und dem *Bac. enteritidis* Breslau entsprachen. Schlirf, sein Nachfolger im Amt, verfolgte dieses Verhalten weiter und fertigte gemeinsam mit mir mehrere Lichtbilder der Ansiedelungen. Ein solches und ein älteres meiner Bilder von Paratyphus B-Bazillen legte er Herrn Prof. Dr. Weichardt vor, der sie nach dem Ausscheiden des Herrn Schlirf in der Med. Welt abdrucken ließ und damit zum ersten Male den Unterschied zwischen den fraglichen Bakterienarten in ihrem Wachstum auf Gelatineplatten in Lichtbildern, wenn auch nicht in besonders guter Wiedergabe, einander gegenüberstellte; dabei war die Angabe über die Hersteller der Bilder verwechselt und bei meinem Namen als Quelle mein Lehrbuch der Bakteriologie angegeben, aber keines der beiden Bilder war bisher veröffentlicht.

Barth (3), der auf die Mitteilung von Knorr (2) hin die Gelatineplatte anwendete, konnte dessen Angaben immerhin bei 89 Proz. seiner Stämme bestätigen, würdigte aber die Brauchbarkeit des Verfahrens weiter nicht, ging er doch von vornherein und grundsätzlich von der Annahme der Einheitlichkeit der Paratyphus B- und Enteritisbazillen aus; einige Zeit vorher hatte er sogar geäußert, die neuen Versuche einer Zweiteilung des Paratyphusbazillus unter Abspaltung der speziell die Fleischvergiftung auslösenden Stämme als Enteritidis-Breslaubazillen halte er mindestens zurzeit für undurchführbar (Barth, 1 u. 2). Dagegen erklärte Leonhardt die Gelatinekultur — er meinte damit die Gelatineplatte — als eine in jedem Falle unerläßliche Ergänzung

der sonstigen Prüfungsverfahren. Seine Bilder sind aber nicht günstig ausgewählt und nicht gelungen genug, um überzeugend und beweisend zu sein.

In allen anderen Veröffentlichungen der letzten 25 Jahre (bis Ende 1927) ist die Gelatineplatte und mindestens das Aussehen der auf ihr gewachsenen Ansiedelungen bei schwacher Vergrößerung nicht mehr berücksichtigt worden; man hatte in züchterischer Hinsicht eine Reihe anderer Unterscheidungsmöglichkeiten, auf die man ausschlaggebenden Wert legte, zunächst das von B. Fischer schon 1892 beschriebene Herabrutschen des schleimigen Rasens der B-Bakterien auf schräg erstarrter Gelatine, das nach einigen Tagen deutlich sichtbar wird. Es hat aber, wie Gundel sagt, als Unterscheidungsmerkmal gegenüber anderen Vertretern der Gruppe nicht die gleiche Bedeutung wie das Wallbildungsvermögen.

Die Wallbildung auf der Agarplatte wurde schon im Jahre 1902 von Conradi, v. Drigalski und Jürgens gelegentlich der Untersuchung einer unter dem Bilde des Typhus verlaufenen Epidemie beobachtet; der Erreger, damals als Saarbrückener Stäbchen bezeichnet, stimmte in allen Punkten mit dem *Bac. bremsis febris gastricae* (Kurth) und dem *Bac. Schottmüller* überein, war also ein B-Bakterium. Dagegen vermißte sie v. Drigalski bei den isoliert stehenden Ansiedelungen eines anderen Erregers, den er bei einer im Mai 1903 in und um Neunkirchen (Bezirk Trier) durch Genuß von Pferdefleisch veranlaßten Massenvergiftung gezüchtet hatte. Damit ist v. Drigalski der erste, der das Vorhandensein oder Fehlen der Wallbildung als unterscheidendes Merkmal gefunden hat. Daß dabei nach der Bebrütung die Haltung bei Zimmerwärme von Bedeutung ist, hat Rr. Müller (1) ermittelt. Sie darf nach W. Gärtner auch nicht zu niedrig sein; schon nach 16 Std. sieht man dann bei schwacher Vergrößerung am Rande, wo später die Wallbildung für das bloße Auge sichtbar wird, eine grobe, radiäre Streifung. Namentlich Bitter (1) legte Gewicht auf die mikroskopische Feststellung dieser Erscheinung, weil sie im Gegensatz zu den Breslaubakterien die Wallbildung deutlich macht und insbesondere für einen Nichtkenner das einzig Ausschlaggebende ist. Wohl alle Untersucher beschäftigten sich mit dieser Frage, verwiesen sei unter anderem auf die Darlegungen von Mießner sowie von Graetz mit ihren Lichtbildern und auf Brinck. Elkeles machte, um die von ihm angenommene Einheitlichkeit der Paratyphus-Enteritisgruppe zu erweisen, geltend, daß man auch bei Breslaubakterien Wälle zu erzeugen vermöge, und zwar durch Erhöhung des Kochsalzgehaltes oder der Wasserstoffionenkonzentration, ja schon bei längerer Fortzüchtung auf gewöhnlichem Agar kämen sie vor, während andererseits B-Bazillen bei längerem Lagern das Wallbildungsvermögen verlieren können. Aber das kommt, wie er selbst zugibt, nur für die fortgeführten, nicht für die frisch aus dem Körper gezüchteten Stämme in Betracht. Das gleiche gilt auch für die Ergebnisse von Knorr und Braun, denen es gelang, durch Züchtung auf einfachem Wasseragar mit Zusatz von milchsäuren Salzen auch bei Enteritisbakterien Schleimwälle hervorzubringen, die sogar manchen Breslaustämmen als neue Eigenschaft blieben.

Ein weiteres züchterisches Merkmal ist die Bildung von Knöpfen auf Raffinoseagar, die Rr. Müller im Jahre 1910 für die Erkennung der B-Bazillen angegeben hat. Für die erste Entscheidung nimmt sie zu lange Zeit in Anspruch (mindestens 4 Tage); übrigens fehlte sie, wie wir sahen, bei manchen B-Stämmen und trat bei 3 unserer Breslaustämme auf. Ferner bekamen wir sie reichlich bei einem auf der Gelatineplatte coli-artig wachsenden Stamm aus Stuhl.

Ferner haben Bitter, Weigmann und Habs für die Erkennung der Breslaubazillen deren Säurebildung von pH 5,38—4,99 in Seitzscher Lösung mit Rhamnose brauchbar gefunden, wenn zu der 15 Std. alten Kultur Methyl-

rot als Indikator gegeben wurde. Um falsche Bewertung oder Fehlergebnisse zu vermeiden, empfahl Knorr (4) die Aussaat reichlich zu machen und in zweideutigen Fällen Gelatineplatten anzulegen, um auf etwaige Abspaltungen von Weinblatt- aus Kuppenformen oder umgekehrt zu fahnden. Bei den mit reinen Kuppen wachsenden B-Stämmen hatte er keinen Versager; sie gaben stets die gelbe Reaktion, selbst bei stärkerer Einsaat nicht die rote wie die Breslaubazillen mit reinen Weinblattformen.

Die Mäusefütterung hält Bitter (4) für ein brauchbares Unterscheidungsmittel insofern, als er im Gegensatz zu den Erfahrungen von Uhlenhuth und anderen unter den vielen hundert Fütterungen, die er mit echten B-Bazillen anstellte, kein Tier an B-Sepsis hat zugrunde gehen sehen. Knorr (2) dagegen sah in München unter 96 mit B-Bazillen gefütterten Mäusen 23 sterben, unter 108 mit Breslaustämmen gefütterten nur 88. Außerdem erklärt er mit Recht diesen Versuch für die Untersuchungspraxis als gegenstandslos, weil er viel zu lange Zeit beansprucht. Eine Erklärung für die Unstimmigkeit der Ergebnisse kann man vielleicht in den Mäuserassen finden, ferner in vorausgegangenen anderen Erkrankungen, in den Ernährungsbedingungen (Hunger) und in der Außenwärme; verwiesen sei auf die Versuche von Knorr (3) an der „poikilothermen“ Maus.

Die von uns untersuchten Stämme haben wir ausschließlich subkutan mit einer Nadelspitze Agarkultur verimpft, um zu erkennen, ob sich das Aussehen der Ansiedelungen nach dem Durchgang durch die Maus in irgendeiner auffallenden Weise ändert. Das war nicht der Fall. An der subkutanen Impfung mit den bisherigen B-Stämmen starben von 32 Mäusen 16 = 50 Proz. in durchschnittlich $10\frac{1}{2}$ Tagen, an Breslaustämmen gingen von 30 Mäusen 24 = 80 Proz. in durchschnittlich 6 Tagen ein.

Die Agglutination mit spezifischen Seren muß selbstverständlich in allen Fällen vorgenommen werden. Allein für sich kann auch sie nicht den Ausschlag geben, sie muß die züchterischen Befunde ergänzen. Hohn und Becker halten wie Bitter eine einwandfreie Trennung der B- von den Breslaubakterien mit monovalenten Seren allein nicht für durchführbar. Die umständliche Rezeptorenanalyse kommt, wie Bitter und Holtz mit aller Entschiedenheit hervorheben, als diagnostisches Hilfsmittel für die Praxis nicht in Betracht. Einen besonderen Wert hat die serologische Prüfung für die Erkennung der Gärtner- und Suipestiferstämmen. Eine kurze und gute Uebersicht über die Frage gab Brinck.

Alle Stämme aus der hiesigen Untersuchungsanstalt, die wir dem Gelatineplattenverfahren unterzogen und auf schräg erstarrter Gelatine weiter beobachteten, waren dort serologisch geprüft worden; nicht immer stimmte der Ausfall mit dem auch in der Anstalt gewonnenen züchterischen Ergebnis; B-Stämme wurden von Breslauserum manchmal in höherer Verdünnung agglutiniert als von B-Serum und umgekehrt.

Nach Vereinbarung mit dem zweiten Direktor der Anstalt, Herrn Prof. Dr. Weichardt, wurden mir seit Mai 1927 einige Monate hindurch die dort unter der Leitung des stellv. Oberarztes, Herrn Dr. Hallmann (meist von Fr. Epstein), frisch aus dem Stuhl oder Blut gezüchteten B-, Enteritis- und auch einige Typhusstämmen auf Schrägagar zunächst ohne Diagnose übergeben, um später zu vergleichen, ob die mit den üblichen züchterischen und serologischen Verfahren dort gewonnenen Befunde auch lediglich auf Grund des Aussehens der Ansiedelungen auf Gelatineplatten erhalten werden können. Wie sich bei den schließlichen Vergleichen mit den Aufzeichnungen des Herrn Dr. Hallmann ergab, war das der Fall, denn wir hatten fast nur zwischen B- und Breslaubazillen zu unterscheiden.

Von jeder uns mit einer Nummer übergebenen Schrägagarkultur überimpften wir in ein Gärungsröhrchen, um die kein Gas bildenden Bakterien, z. B. Typhusbazillen, von vornherein auszuschalten. Mit den Gasbildnern wurde später eine Maus mit einer Nadelspitze Agarkultur subkutan geimpft.

Die für die Gelatineplatte geeignete Verdünnung wurde dadurch erzielt, daß man eine Nadelspitze der eintägigen Agarkultur in 5 ccm Nährbrühe, daraus eine 2 mm-Oese in weitere 5 ccm Nährbrühe und von hier zwei 2 mm-Oesen in 10 ccm Nährgelatine übertrug. Die damit gegossene Schale ließen wir in der warmen Jahreszeit in einem kühleren Zimmer, in der kalten im gleichen Raum oder in einem auf etwa 19° erwärmten Brutschrank stehen und musterten sie an den folgenden Tagen bei etwa 35facher Vergrößerung (Leitz 2, Okular 3) durch.

Die Nährgelatine muß mit Fleischwasser bereitet sein; wir nehmen meist Pferdefleisch. Fleischextrakt- oder Hottinger-Brühe eignen sich für sie nicht, denn sie beeinflussen das Aussehen der Ansiedelungen und beide können noch etwas peptonisierendes Ferment enthalten, wodurch der Schmelzpunkt herabgedrückt wird. Auch ein vorschriftsmäßig mit Fleischwasser und 10—11proz. Gelatine bereiteter Nährboden wird bei 23—24° weich bis zähflüssig und ist in diesem Zustande als fester Nährboden nicht mehr brauchbar. Einen niedrigeren Schmelzpunkt durch vermehrten Gelatinezusatz auszugleichen, ist nicht gut, weil das bezeichnende Aussehen der Ansiedelungen leidet.

Wenn auch die Paratyphus- und Enteritisbakterien nicht besonders empfindlich sind und bei Alkaleszenzgraden gut wachsen, die mehr oder weniger über dem Lackmuspunkt liegen, so scheint doch der beste Grad etwa bei pH 7,5 zu sein, also um die Wasserstoffionenkonzentration des arteriellen Blutes (pH 7,45). Man erreicht diesen Punkt ziemlich genau, wenn man nach der Lösung von Wittepepton, Kochsalz und Gelatine im Fleischwasser 10 ccm mit $n/10$ NaOH zum Phenolphthaleinpunkt titriert, auf 1 Liter berechnet und die Hälfte der nötigen Alkalimenge mit $n/1$ NaOH zugibt (hier orientierende Prüfung mit Lackmuspapier) und dann noch $\frac{1}{4}$ der austitrierten Alkalimenge mit $n/1$ Na_2CO_3 hinzufügt, also im ganzen auf 75 Proz. alkalisiert. Nun setzt man zur Klärung Eiweiß, z. B. Albumen ovi siccum in Wasser eingequirlt und Mundspeichel (nach Rother) hinzu, dämpft etwa $\frac{3}{4}$ Std. und filtriert dann im Warmwassertrichter. Gewöhnlich geht danach die Reaktion ein wenig zurück¹⁾.

Zur Bestimmung des pH -Punktes zwischen 6,8 und 8,2 genügt die m-Nitrophenolreihe nach L. Michaelis im Walpoleschen Komparator; unsere nach seiner Vorschrift hergestellten Verdünnungen stimmten mit den Ergebnissen der Gaskette. Diese sind bei Nährbrühe zwar mit mehr Zeitaufwand, aber ohne Schwierigkeit genau zu ermitteln, weniger einfach bei unverdünnter Nährgelatine; bei ihr kann es $\frac{1}{2}$ bis einige Stunden dauern, bis ein gleichbleibendes Ergebnis erreicht ist. Die Hydrochinonelektrode paßt weniger, schon weil sich das Hydrochinon zersetzt, wenn man es in eine heiße Lösung gibt, man wird besser die umständlichere Wasserstoffelektrode nehmen. Wir arbeiten mit dem Elektroionometer nach Lüers (von F. u. M. Lautenschläger). Die Bestimmung mit dem Doppelkeilkolorimeter nach Bjerrum-Arrhenius (von F. u. M. Lautenschläger) beruht auf dem gleichen Grundsatz wie die mit dem Walpoleschen Komparator, hat aber vor ihm den Vor-

1) Bei allen Arbeiten wurde ich in zuverlässiger Weise von dem seit 30 Jahren im Institut tätigen Oberpräparator Herrn Joseph Schmidt unterstützt. Er bereitet alle Nährböden, sicherte die Reinzuchten, legte die Gelatineplatten und Tierversuche an und machte die meisten der 415 mikrophotographischen Aufnahmen von Ansiedelungen. Die Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration lag in den Händen des Assistenten Herrn Kurt Foerst.

teil, daß man jede pH -Zahl ermitteln kann, nicht bloß Einzelwerte in bestimmten Abständen von 0,2, zwischen denen man abschätzen muß. Die von der Fabrik beigegebenen zweifarbigen Indikatoren nach Clark und Lubs eignen sich für unsere Zwecke weniger, wahrscheinlich stört hier das Pepton und die Gelatine; besser läßt sich die Bestimmung auch hier mit den einfarbigen Indikatoren von Michaelis erzielen. Herr Dr. Hans Kroepelin hat die Skalenwerte dafür berechnet und wird sie in der Biochemischen Zeitschrift veröffentlichen. Das Folienkolorimeter von Wulff liefert wenigstens für unsere Nährgelatine nicht genügend genaue Angaben; auch hier liegt es an dem Pepton- und Kolloidgehalt des Nährbodens. Mag man mit dem oder jenem Apparat arbeiten, in keinem Falle versäume man zur ungefähren Kontrolle das allereinfachste, nämlich die Prüfung der Reaktion auf gutem Lackmuspapier.

Die Lichtbilder machten wir, um das Aussehen der auf der Gelatineplatte gewachsenen Ansiedelungen festzuhalten und um nicht auf die unzuverlässige Erinnerung angewiesen zu sein, von bestimmten, besonders bezeichneten Ansiedelungen meist an mehreren der folgenden Tage, und zwar solange sie bei unserer üblichen 35fachen Vergrößerung noch im Gesichtsfelde Platz hatten, bei dieser; wenn sie für das Gesichtsfeld zu groß geworden waren, bei entsprechend schwächerer. Mitunter nahmen wir Uebersichtsbilder bei ganz schwacher Vergrößerung auf, z. B. Fig. 9, 10, 11 und 13, oder in natürlicher Größe, wie Fig. 7, 8 und 25. Für die 20—35fache Vergrößerung und etwas darüber ist ein System mit 6facher Eigenvergrößerung am geeignetsten, also Zeiß 6 oder Leitz 2; diese Systeme besitzen zugleich einen genügenden Objekt- abstand, so daß man mit der Platinnadel unter dem Mikroskop bequem abimpfen kann. Mit dem nächst stärkeren Trockensystem mit geringerem Fokal- abstand, Zeiß 10 (entsprechend dem früheren AA) oder Leitz 3, werden die Bilder der Ansiedelungen flacher und weniger kontrastreich. Geht man andererseits mit der Vergrößerung herunter und nimmt man Systeme mit größerer Brennweite, dann wird die Körperlichkeit gesteigert, die feinere Zeichnung verschwindet und an gewissen Stellen kommen tiefe Schatten. Beispiele dafür sind die Bilder 12 und 14; beide sind bei annähernd der gleichen Vergrößerung aufgenommen (20- und 19fach), aber Fig. 12 mit aa 6, Fig. 14 mit dem Projektionssystem 35 mm (entsprechend dem heutigen „Mikrotar“). Daraus ergibt sich die Forderung, daß bei jedem Lichtbild vermerkt sein soll, welches Objektiv und Okular verwendet wurde. Die Vergrößerung darf nicht bloß annähernd angegeben werden, sie muß mit Hilfe eines Objektmikrometers festgestellt sein; für die schwachen Vergrößerungen genügt ein mm-Maßstab auf Glas.

Die hier wiedergegebenen Bilder sind mit der Zeißschen großen mikrophotographischen Einrichtung mit umgelegtem Mikroskop gefertigt. Für die schwachen Vergrößerungen wurde eine gewöhnliche Drahtfadenlampe benutzt, hinter die eine Mattscheibe, das Tartrazinfilter und die Blende gesetzt waren. An Stelle des Abbeschen Beleuchtungsapparates braucht man für die Aufnahmen mit den Systemen bis 6facher Eigenvergrößerung einen Brillenglas- kondensor (Näheres siehe in dem Abschnitt Mikrophotographie in meinem Lehrbuch. 6./7. Aufl. S. 657—672). Wer die große mikrophotographische Einrichtung nicht anschaffen will, kann seinen Zweck vollkommen erreichen, wenn er eine Kamera mit Balg an einem geeigneten Stativ in lichtdichter Verbindung über das aufrecht stehende Mikroskop bringt, wenn nur Licht und Blende richtig zentriert sind. Durch Verwendung eines entsprechenden Okulars kann der Balgauszug wesentlich kürzer genommen werden, als es bei den von uns verwendeten Projektionsokularen mit nur 2- oder 4facher Vergrößerung der Fall war. Bei der Prüfung des Bildes auf der Mattscheibe vermeide man ein Dunkeltuch, weil es Staub und Zeugfasern auf die Kulturplatte fallen läßt.

Statt seiner kann man einen Kasten aus Pappe nehmen, der auf den Mattscheibenrahmen gestellt wird. Sein Boden (24×24 cm) hat einen Ausschnitt für das Mattscheibenbild, seine 3 Seitenwände sind 24 cm hoch. Ein schräges Dach überhöht die offene Seite um 12 cm und fällt nach der vorderen geschlossenen Seite zu ab (Heim, 4). Aufsatzkamas mit in der Länge unveränderlichem Gehäuse sind zwar recht bequem, da aber ein Okular bereits in sie eingebaut ist, läßt sich mit einem Objektiv immer nur eine einzige Vergrößerung erzielen, ihre Leistung ist also gerade für die Aufnahme von Ansiedelungen viel zu beschränkt.

Bac. paratyphi B (Schottmüller).

Das eigenartige Aussehen ihrer Ansiedelungen gegenüber denen der Typhus- und Enteritisbakterien ist schon fürs bloße Auge nicht zu verkennen. Gewöhnlich am zweiten Tage oder schon etwas früher sind weiße Kuppen erschienen ähnlich denen von *Bac. lactis aërogenes* oder von Friedländer-Bazillen (Heim, 2). Noch eindeutiger ist das Bild, das man bei schwacher Vergrößerung erhält. Von der je nach dem Alter mehr oder weniger durchsichtigen Mitte gehen flammenförmige oder mehr gerade Strahlen nach dem Rande der Ansiedelung zu. Danach verschwindet die Zeichnung immer mehr, die Ansiedelungen werden undurchsichtiger, nur der Rand kann noch strahlig sein (Fig. 1—3). In Fig. 2 ist das Aussehen etwas anders als in Fig. 1, aber aus den Organen einer Maus, die der subkutanen Impfung nach 26½ Tagen erlegen war, wuchsen wieder Ansiedelungen genau wie in Fig. 1. Bei einem anderen Stamm, der das Bild von Fig. 1 bot, gingen aus der Maus, die der subkutanen Impfung nach 8 Tagen erlegen war, Ansiedelungen auf, wie sie Fig. 4 zeigt. Als seltene Ausnahmen bilden manche Stämme keine Kuppen. Bitter (4) sah hie und da auf der Agarplatte typhusartige, nicht wallbildende Kolonien und warnt mit Recht vor Verallgemeinerung einzelner Fälle (siehe auch die Zusammenstellung von Brinck, a. a. O. S. 310). Auch uns begegnete einmal ein Stamm, dessen Ansiedelungen auf der Gelatineplatte in den ersten Tagen ganz flach und typhusähnlich waren. Nach Mitteilung der Untersuchungsanstalt wurde er von Breslauserum gleich hoch wie von B-Serum (1:800) agglutiniert, bildete aber auf der Agarplatte Wälle, auf Raffinoseagar Knöpfe und zeigte in Rhamnosebrühe nach Zusatz von Methylrot Gelbfärbung. Er rührte von einem Bazillenträger her. Im weiteren Verlaufe erschienen auf der Gelatineplatte Kuppen und auf Schräggelatine Schleim mit dickem Tropfen am Ende des Ausstrichs.

Bei der Abimpfung der kuppenförmigen Ansiedelungen auf schräg erstarrte Gelatine haben wir das dicke, schleimige Wachstum in keinem Falle vermißt. Die Oberfläche der Gelatine wird dabei namentlich in den unteren Abschnitten, wo der Schleim reichlicher ist, trüb. Zwar kam es nicht jedesmal zum Abrutschen des Schleims in die Kuppe des Röhrchens, aber auch ohne dieses ist das Aussehen des „dicken Tropfens“, wie es Bitter (2) nannte, in Gestalt eines weißen, rotartigen Belags ganz unverkennbar. Wenn es andere Untersucher nicht oder nicht regelmäßig beobachten konnten, so läßt sich dafür ohne Kenntnis der Bedingungen, unter denen die Züchtung stattfand, keine Erklärung geben. Wir haben die Schleimbildung immer und zwar nicht bloß auf Gelatine mit dem pH -Punkt von 7,6, sondern sogar bei pH 6,3 gesehen, im Brutschrank bei 21° kam sie etwas früher als bei Zimmerwärme und hier auch, wenn es zwischendurch nachts kalt geworden war. Aber selbst in der warmen Jahreszeit trat sie etwas später auf als die Erscheinung der Kuppen auf der Gelatineplatte. Mit der Wallbildung auf Agar hat man die Entscheidung auch nicht früher als am 2. Tage, da die Agarschale nach der eintägigen

Bebrütung mindestens noch 1 Tag bei Zimmerwärme gehalten werden muß. Auf Blutserum, das bei vorsichtiger Einwirkung der Wärme halbdurchsichtig erstarrt ist, kann sich der Schleim so reichlich bilden, daß er abläuft und von der umgekehrten Platte in die Deckschale tropft.

Die Rhannosereaktion wurde in der Untersuchungsanstalt bei allen Stämmen angelegt; wir konnten darauf verzichten, denn die Gelatineplatte brachte den genügenden Aufschluß. Vollends die Prüfung der Knopfbildung auf Raffinoseagar halten wir aus den bereits angegebenen Gründen für entbehrlich.

Gibt somit die Gelatineplatte bei schwacher Vergrößerung bereits ein brauchbares Mittel zur Erkennung der Paratyphusbazillen und, wie weiterhin gezeigt werden soll, zur Unterscheidung von den Breslaubazillen, so wird das Urteil vervollständigt, wenn man einen Abstrich färbt und ihn mit der Oelimmersion durchmustert. Wie ich schon in meinem Lehrbuch (6./7. Aufl. auf Taf. VII, Fig. 43) gezeigt habe, sieht man um die Stäbchen zum Unterschied von den Typhus- und Paratyphus A- und, wie wir jetzt hinzusetzen können, auch von den Breslaubazillen eine breitere Hülle. Diese hat später auch E. Löffler beschrieben und als Kapsel bezeichnet. Zimmerwärme und Sauerstoffzufuhr fand er als die besten Bedingungen für ihre Entwicklung. Ihr Vorhandensein schloß er aus dem Verhalten der Bakterien in Aufschwemmungen gegenüber verschiedenen Fällungsreaktionen, aber alle Versuche, die Kapsel durch Färbung oder mit dem Tuscheverfahren sichtbar zu machen, schlugen fehl. Auch uns gelang es nicht. Im Ausstrich des bei Zimmerwärme auf der Oberfläche des Nährbodens entstandenen Schleims erkennt man nach der Färbung mit rotstichigem Methylenblau violetttrötliche Bezirke in der Umgebung der Bakterien mit ihrer ungefärbten Hülle. Diese Reaktion ist ähnlich, aber nicht genau so rosafarben, wie ich sie 1901 bei Milzbrandbazillen beschrieben habe und wie sie auch bei anderen Kapselbakterien, z. B. den Friedländerschen, vorhanden ist. Die Stäbchen selbst sind in einem mit Methylenblau gefärbten Ausstrich ähnlich, wie ich sie bei Friedländer-Bakterien auf Taf. II Fig. 7 meines Lehrbuchs abgebildet und beschrieben habe, im Innern vielfach gar nicht gefärbt, wie leer, bei anderen ist ein Rest von Endoplasma als kleiner Punkt oder als feines blaues Strichelchen vorhanden. Gut und kräftig gefärbt sind sie in dem hier beigegebenen Bild Fig. 5, wo der Ausstrich der 3 Tage bei etwa 20° und 1 Tag im Zimmer gehaltenen Reinzucht mit Gentianaviolett gefärbt war; sie sind meist kurz, zwischendurch liegen mittellange und lange Scheinfäden; alle sind von einer breiten, ungefärbten Hülle umgeben. In der raschen Beweglichkeit, die den B-Bakterien eigen und die durch zahlreiche Geißeln bedingt ist, werden sie durch die Schleimbildung nicht behindert.

Bac. breslaviensis.

Kaensche züchtete diese Art im Jahre 1893 im Flüggeschen Institut zu Breslau auf Gelatine- und Agarplatten aus dem Fleische einer notgeschlachteten Kuh, nach dessen Genuß über 80 Personen erkrankt waren. Er erwähnte unter seinen Vorgängern diejenigen, die Gärtner-Bazillen gezüchtet hatten. Aber 1 Jahr zuvor hatte de Nobeles bei einer Fleischvergiftung zu Aertrycke in Westflandern aus dem Fleisch und dem Knochenmark eines Kalbes mit schwerer Enteritis einen dem Gärtner-Bazillus züchterisch ähnlichen, aber serologisch von ihm verschiedenen Erreger gezüchtet, der als besonderer Typus Aertrycke diesem gegenüber gestellt wurde (Standfuß). Mit diesem Namen geht er vielfach und namentlich im Ausland (z. B. bei Savage und White), in Deutschland gewöhnlich als Breslaubazillus.

Er unterscheidet sich von dem B-Bazillus durch das Fehlen der breiteren Außenschicht; die auf der Gelatine gewachsenen Stäbchen sind dünner, kurz, nur von einem schmalen Ektoplasmasaum, wie er auch anderen Bakterien eigen ist, umgeben und bildet keine langen Scheinfäden. Die in Fig. 6 wieder-gegebenen Stäbchen waren 4 Tage bei Zimmerwärme gewachsen. Auf Schräggelatine entsteht unter Trübung der Oberfläche ein trockenerer, leicht irrisierender Belag und kein Schleim. Auf der Gelatineplatte unterscheiden sich die Ansiedelungen schon bei der Betrachtung mit bloßem Auge von denen der B-Bazillen durch das Fehlen der Kuppen. Fig. 7 zeigt diese bei B-Bazillen, Fig. 8 die flacheren Ansiedelungen der Breslaubazillen in natürlicher Größe auf schwarzer Unterlage. Noch deutlicher sind die Unterschiede in Fig. 9 und 10 bei 3facher Vergrößerung im durchfallenden Licht, wo die Ansiedelungen der B-Bazillen fast keine, die der Breslaubazillen eine deutliche Zeichnung erkennen lassen. Zum Vergleich sind ihnen die noch zarteren und flacheren Ansiedelungen der Typhusbazillen in Fig. 11 an die Seite gestellt. Von diesen unterscheiden sie sich züchterisch leicht schon durch die Gasbildung in Zuckerbrühe, die den Typhusbazillen fehlt. Bei etwas stärkerer Vergrößerung sind nicht zu alte Ansiedelungen denen von Coli-Bakterien ähnlich. Fig. 12 zeigt eine 3 Tage alte in 20facher Vergrößerung. In dem ihm gegenüberstehenden Bilde Fig. 14 stellt sich die Ansiedelung ganz anders dar, so daß man auf den ersten Blick kaum glauben möchte, daß beide Bilder genau die gleiche Ansiedelung darstellen. Die beiden Aufnahmen wurden kurz nacheinander gemacht, um den im Vorstehenden bereits erwähnten Unterschied in der Wirkung von Systemen verschieden langer Brennweite zu erweisen.

Da die Ansiedelungen der Breslaubazillen meist rascher größer werden als die der B-Bazillen, mußten die Vergrößerungen geringer genommen werden; in Fig. 12 nimmt die 3 Tage alte das ganze Gesichtsfeld des Systems aa 6 ein. Wenn sie dicker geworden sind und ihre coli-ähnliche Zeichnung verschwunden ist, sehen sie unter dem Mikroskop eigenartig lehmfarben aus und lassen nur wenig Zeichnung erkennen (Fig. 15), höchstens daß nach dem Rande zu noch ein Kranz feiner Strahlen vorhanden ist (Fig. 17). Diese Lehmfarbe ist ein bezeichnendes Merkmal. Mitunter zeigen die Ansiedelungen einen konzentrisch gelagerten Kranz nach innen gerichteter Strahlen (Fig. 16 und 19). Solche „Innenstrahlen“ haben wir bei 12 Stämmen im Lichtbild festgehalten, davon waren 3 der gleichen Herkunft, und zwar aus den Stühlen von 3 Brüdern (Fig. 19), ferner in den Stämmen „Mundenheim“ der Untersuchungsanstalt Landau¹⁾ sowohl in dem aus Streichleberwurst als auch in dem aus Stuhl des Kranken gezüchteten (Fig. 16); 2mal fanden sie sich in den Stühlen eines Kindes, die im Zwischenraum von mehreren Tagen eingesandt waren, hier beide Male erst nach dem Durchgang durch die Maus; die beiden Mäuse waren der subkutanen Infektion nach 5 Tagen erlegen. Diese Befunde weisen auf ein besonderes Verhalten gewisser Enteritisstämme hin. Ob ihnen mehr oder weniger Bedeutung beizumessen ist als der von Aoki und Hayashi ausschließlich auf agglutinatorischem Wege ermittelten Trennung der Breslaubazillen in zwei Typen, Mäusetyphus- und Newporttypus, muß dahin gestellt bleiben. Das gilt auch von anderen gelegentlich beobachteten züchterischen Merkmalen. Bei einem von 3 Stämmen aus Würzburg fiel reichliche Kristallbildung im Bereich der Ansiedelungen und ihrer nächsten Umgebung auf; alle 3 Stämme zeigten dem bloßen Auge auf Lackmuslaktoseagar sehr ausgesprochen eine

1) Den Hygienischen Instituten und Bakteriologischen Untersuchungsanstalten in Frankfurt a. M., Freiburg i. B., Jena, Landau (Pfalz), München, Oldenburg, Potsdam und Würzburg danke ich auch an dieser Stelle für die gütige Ueberlassung verschiedener Stämme, insbesondere von Nahrungsmittelvergiftern.

Fältelung am Rande der tiefblau gewachsenen Ausstriche. Dieses von einigen Untersuchern hervorgehobene Merkmal konnten wir einmal bei mehreren, aber nicht bei allen unserer Breslaustämme und bei unserem Sammlungsstamm von *Mäusetyphus* beobachten. Bei einer späteren Wiederholung der Ausstriche erschienen solche Fältelungen nicht mehr. Knorr hat ein bei der mikroskopischen Besichtigung der Ansiedelungen auf der Agarplatte sich bietendes Aussehen der Randzone als korallenförmig bezeichnet, und wir haben es im Jahre 1925 von einem der von ihm gezüchteten Fleischvergifter („Wendelstein“) im Lichtbild festgehalten; es entspricht dem von Mießner, a. a. O. S. 255 veröffentlichten Bild der 4 Tage alten Ansiedelung von *Bact. abortus equi* auf Gassner-Platte. Bei unseren Stämmen haben wir es nicht mehr gefunden.

Bac. enteritidis Gärtner.

Fleischvergiftungen beim Menschen durch diesen Erreger sind verhältnismäßig selten (Graetz), Erkrankungen beim Tier wurden mehr vereinzelt, aber doch auch seuchenhaft in Rinderbeständen beobachtet, so von Lütje (1) im Jahre 1926 und bald darauf von Lehr. Lütje (2) nannte ihn *Bact. paratyphi bovis*, mit Recht aber erklärt Bitter (4) diese Benennung für außerordentlich unglücklich, denn der Name *Paratyphus* entstammt der Menschenmedizin; er soll sagen, daß eine dem Typhus abdominalis ähnliche Krankheit vorliegt, ob aber beim Tier eine dem menschlichen Typhus entsprechende Krankheit vorkomme, sei mehr als zweifelhaft. Neuerdings hat Lehr (2) diese Frage nach der Richtung beantwortet, daß tatsächlich *Paratyphus B-Bazillen* beim Tier vorkommen, denn er fand bei zwei notgeschlachteten Pferden Bakterien, die sich eindeutig als solche bestimmen ließen. Dieser Befund weist wieder darauf hin, wie notwendig es ist, sich klar auszudrücken und Verwirrungen zu vermeiden. Krankheitserreger beim Tier oder Fleischvergifter des Menschen, die keine *Paratyphus B-Bazillen* sind, dürfen diesen Namen nicht tragen; sie dürfen nicht *Bact. paratyphosum enteritidis Gärtner* bzw. Breslau — was außerdem dem Gebrauch der Zweinamengebung zuwiderläuft — genannt werden, wie es Elkeles (4) u. a. taten. Die Gruppe *Paratyphaceen* zu nennen, was von einigen Seiten geschah, geht schon deshalb nicht an, weil das Wort von Typhaceen abgeleitet ist, dieser Name aber bereits für die Rohrkolbengewächse vergeben ist.

A. Gärtner fand den *Bac. enteritidis* im Jahre 1888 bei einer Fleischvergiftung von 58 Personen durch Fleisch einer notgeschlachteten Kuh in Frankenhausen am Kyffhäuser und züchtete ihn mit Hilfe der Gelatineplatte rein. Die oberflächlichen Ansiedelungen beschrieb er als linsen- bis erbsengroß, in hohem Maße durchscheinend, nur sehr wenig gefärbt, im Innern gewöhnlich mit einem graugelblichen Farbenton, bei 100facher Vergrößerung scharfrandig und auffallend grob gekörnt, ähnlich wie Kolonien von dicken Kokken oder kleinen Hefen.

Eine genauere Beschreibung der Erreger gab B. Fischer im Jahre 1902 auf Grund der von ihm bei den Fleischvergiftungen in Rumfleth 1892 und in Haustedt 1895 gezüchteten Bakterien, die sich nach der unterdessen eingeführten Agglutination als Gärtner-Bazillen erwiesen (Titer des spezifischen Ziegen-serums 1:40000 gegenüber Breslaubakterien 1:40). Die oberflächlich gelegenen Ansiedelungen der Rumflether Bazillen auf der Gelatineplatte beschrieb er als am 3. Tage über stecknadelgroßkopf, grauweiß bis rein saftig, manchmal wie rahmähnliche Tröpfchen mit gleichmäßigem Rande, ziemlich grob, aber gleichmäßig gekörnt, wie sie zuweilen bei Bakterien der Friedländer-Gruppe angetroffen werden. Auf Schräggelatine war die Auflagerung

annähernd so üppig wie bei Friedländer-Bakterien, manchmal rutschten die Kulturmassen ab. Fischer war auch der erste und ist seitdem der einzige geblieben, der Lichtbilder von einigen Ansiedelungen gab; nur stimmt seine Beschreibung nicht ganz mit ihnen. Ihr zufolge kann kein Zweifel sein, daß sich die beobachteten Ansiedelungen auf Gelatine ähnlich denen der Paratyphus B-Bazillen, wie man sie heute kennt, verhielten. Die von ihm abgebildeten rührten aber von längere Zeit fortgezüchteten Stämmen her und Fischer gibt selbst an, daß sich das eigenartige Wachstum auf Gelatine bei längerer Fortzucht verändert, wie das auch schon Gärtner beobachtet hat. Sein Lichtbild der ursprünglichen Gärtner-Bakterien zeigt die ausgesprochene flache Form. Solche typhus- und coliähnliche Oberflächenansiedelungen sah er beim Rumflether Stamm zuerst 3 Monate nach der Gewinnung auftreten, mit der Zeit ging das typische Wachstum ganz verloren; beim Haustedter Stamm tauchten sie nach 1 Jahre auf und gewannen sehr bald die Oberhand.

Diese Zwiespältigkeit der Gärtner-Bazillen beobachteten auch wir bei einem Stamm aus Oldenburg, wo ihn Schlirf von Personen, deren mehrere nach dem Genuß von Bratwürsten erkrankt waren, gezüchtet hatte, und bei dem Stamm 329 aus dem Veterinäruntersuchungsamt zu Potsdam, wo er Ende 1926 aus einer der erkrankten Kühe rein gezüchtet worden war. Es gingen sowohl Kuppen- wie flache Formen auf. Jene glichen am 2. Tage (Fig. 21) denen von Paratyphus B-Bazillen und wurden nachher mehr und mehr undurchsichtig; die coli-ähnlichen (Fig. 20) blieben durchsichtiger und zeigten später Strahlen nach dem Rande zu (Fig. 24), ähnlich wie das Lichtbild einer 3 Wochen alten Ansiedelung von B. Fischer (1); andere wiederum bekamen schollenartiges Gefüge, wie in Fig. 22, wo der Rand noch die Coli-Form erkennen läßt. Auf Schräggelatine war das Wachstum ausgesprochen schleimig und Ausstriche davon mit Gentrinaviolett gefärbt, ergaben Bakterien mit breiten Hüllen (Kapseln), wie sie die Paratyphus B-Bazillen (Fig. 5) haben. Trotzdem wuchsen aus den ganz schleimigen Stellen auf der Gelatineplatte flache, coli-ähnliche Ansiedelungen, deren eine Fig. 20 zeigt.

Unter 3 Gärtner-Stämmen aus dem Hygienischen Institut in Jena befand sich der ursprüngliche. Alle 3 wuchsen, wie zu erwarten, flach und typhusähnlich; Stamm 3 bekam nach einigen Tagen dicht stehende Körner. Auf Schräggelatine bildeten sie keinen Schleim, und im gefärbten Ausstrich fehlten die Hüllen.

Bei frischen Gärtner-Stämmen aber ist die Eigenschaft Kuppen- und flache Formen zu bilden, die Regel; bei Paratyphus B-Bazillen ist sie eine ganz seltene Ausnahme; Breslaubazillen spalten nach Knorr (2) niemals Kuppenformen ab.

Ein weiterer *Bac. enteritidis* (Freiburg?).

Knorr und Braun haben bei einigen erst für Breslaubazillen gehaltenen Stämmen auf Gelatineplatten ein dem Gärtner-Bazillus ähnliches Verhalten wahrgenommen, aber serologisch konnten sie sie von ihm trennen und glauben sie als Fleischvergifter Freiburg (Uhlenhuth und Seiffert) ansprechen zu dürfen. Auch unter den uns von der Untersuchungsanstalt übergebenen Stämmen befanden sich, gezüchtet aus Stühlen von Mitgliedern einer Familie, drei, mit denen es uns ebenso ging. Auch sie wurden eine Zeitlang als Breslaustämme geführt, bis sich bei dem einen (Stamm 50) auf der schräg erstarrten Gelatine dicker Schleim zeigte, der abrutschte, während der andere (Stamm 48) einen trockeneren Belag wie Breslau gebildet hatte. Beide hatten subkutan Mäuse nach 8 und 7 Tagen getötet. Der dritte, bei dem die Maus am Leben

geblieben war, war nicht weiter geführt worden. Bei der Nachprüfung in der Untersuchungsanstalt reagierten jene beiden Stämme auf Gärtner-Serum nur in der Verdünnung 1:100, mit Breslau- sowie mit B-Serum 1:400 und 1:200. Geringe Agglutination in Paratyphus B- und Breslauserum, aber keine in Gärtner- und Suipestifer-Serum bekam Herr Med.-Rat Dr. Schlirf, dem ich den Stamm 50 zur Prüfung nach Oldenburg gesandt hatte.

Auf Gelatineplatten waren ursprünglich flache Ansiedelungen gewachsen; bei Stamm 48, dem die subkutan geimpfte Maus nach 8 Tagen erlegen war, fiel das zerrissene Aussehen auf (Fig. 18); der Stamm 50 aus der nach 7 Tagen gestorbenen Maus zeigte nach 5 Tagen ein scholliges Gefüge (Fig. 13), wie es auch bei Gärtner-Bazillen (Fig. 22) vorkommen kann.

Als die beiden Stämme von Schräggelatine weg nach einigen Monaten wieder auf Gelatineplatten geprüft wurden, bildete der wie Breslaubazillus wachsende Stamm 48 nur coli-ähnliche Ansiedelungen, die aber im Innern bald bräunlichgelb wurden; dagegen gingen aus dem schleimbildenden Stamm 50 vorwiegend kuppenförmige Ansiedelungen mit flammenförmiger Zeichnung auf, daneben in geringer Zahl flache coli-ähnliche, aber auch sie wurden in den folgenden Tagen kuppenförmig und waren unter dem Mikroskop bräunlich und ganz undurchsichtig. Nach einigen Wochen waren diese Ansiedelungen erhaben, in der Mitte etwas eingesunken und 3—5 mm groß.

Ausstriche aus den flachen Ansiedelungen des Stammes 48 enthielten Stäbchen ohne Hüllen ähnlich den Breslaubazillen in Fig. 4; die aus den kuppenförmigen zeigten Stäbchen und hie und da lange Scheinfäden mit Hüllen von dem gleichen Aussehen wie die B-Bazillen in Fig. 3.

Außerdem prüften wir noch das Verhalten der beiden Stämme mit dem kürzlich von Pesch und Maschke angegebenen Verfahren: Auf Wasseragar mit Ammoniumchlorid als alleiniger Stickstoff- und Rhamnose als alleiniger Kohlenstoffquelle sollen B- und Gärtner-Bazillen binnen 2 Tagen nicht wachsen, wohl aber Breslaubazillen. In dieser vollständigen Gegensätzlichkeit bekamen wir den Ausfall nicht. Wenn man nur mit bloßem Auge im durchfallenden Licht die beimpften Platten nach 1 Tag ansieht, scheint es allerdings, als wären die Paratyphus- und die Gärtner-Bazillen nicht gewachsen; betrachtet man die Platten aber im auffallenden Licht und vollends unter dem Mikroskop bei schwacher Vergrößerung, dann findet man überall Wachstum, namentlich nach 2tägiger Bebrütung; doch stimmen die Angaben von Pesch und Maschke wenigstens insoweit, als die Breslaubazillen wesentlich größere und deutlicher in die Augen fallende Ansiedelungen bilden als die beiden anderen. Unsere beiden Stämme wuchsen wie die Breslaustämme. Einzelne Ansiedelungen, die am Rande des mit der Kuppe eines sterilisierten Reagenzglases angelegten Ausstriches, d. h. des zusammenhängenden Rasens, lagen, maßen 0,75—1 mm. Diese Größe erreichten von 10 Paratyphusstämmen nur 3 und auch nur dann, wenn sie ganz getrennt lagen; bei den übrigen 7 war nach 1 Tag mit bloßem Auge fast noch nichts zu sehen; am 2. Tage waren die wasserhellen Ansiedelungen höchstens 0,04—0,4 mm groß geworden, und ähnlich war das Aussehen der mit Gärtner-Bazillen (Oldenburg und Potsdam) besäten Bezirke, deren Ansiedelungen zu 0,07—0,18 mm gemessen wurden, und die des Suipestifer Offenbach mit höchstens 0,6 mm. Die Ergebnisse waren ungefähr die gleichen, ob die Reaktion des Agars pH 5,8 oder ob sie pH 6,9 war; auf diesem hatten wir die etwas größeren Ansiedelungen.

Für den von Pesch und Maschke verfolgten Zweck erscheint zwar dieser Nährboden brauchbar, aber ich halte ihn dazu für entbehrlich, weil man den Unterschied zwischen Paratyphus- und Breslaubazillen auf der Gelatineplatte viel einfacher und sicherer bekommt. Dagegen bot er für die Unterschei-

derung der fraglichen Freiburg-, von den Gärtner- und Suipestiferstämmen eine weitere Stütze.

Der Salzagar ist in seinem Salzgehalt ungenau, und er ist umständlich herzustellen, weil der Fadenagar nach der Vorschrift 24 Std. in fließendem Leitungswasser und dann nochmal 24 Std. in dest. Wasser unter wiederholtem Wechseln gewässert werden soll. Dann werden ihm auf 1 Liter 1 g Dikaliumphosphat zugesetzt (wir nahmen das beständigere primäre Salz), ferner 0,5 g Magnesiumsulfat, 0,02 g Kochsalz, Spuren von Ferrosulfat und neutralem Kalziumphosphat, endlich 1,63 g Ammoniumchlorid; nach der Verflüssigung im Autoklaven wird er auf pH 8,0 alkalisiert, mit 2 g Rhamnose versetzt, im Dampftopf $\frac{1}{2}$ Std. sterilisiert und ausgegossen. In der Salzlösung muß sich, soweit die verhältnismäßig geringe Menge Magnesiumsulfat dazu ausreicht, unlösliches Ammonium-Magnesiumsulfat bilden, das ausfällt, etwas Magnesiumsalz bleibt in der sauren Flüssigkeit wohl noch in Lösung; wenn dann mit Natronlauge alkalisiert wird, sowie beim weiteren Erhitzen geht viel Ammoniak gasförmig weg, und die auf pH 8,0 alkalisierte Lösung wird wieder sauer; in einem Falle ging die Reaktion auf pH 5,8 zurück, in einem anderen, wo wir Natronlauge bis über pH 8,3 zugegeben hatten, auf pH 6,9. Die reichlichen Niederschläge suchten wir möglichst gleichmäßig auf die einzelnen Schalen zu verteilen.

Nach ihrem Verhalten auf diesem Salzagar, auf Grund des Ausfalls der Agglutination und bei der Zwiespältigkeit des Aussehens der Ansiedelungen auf der Gelatineplatte konnten die fraglichen Stämme 48 und 50 keine Paratyphus B-Bazillen sein, aber auch keine Breslaubazillen, obwohl sie ihnen auf dem Salzagar glichen, denn für diese sprach nicht das Ergebnis der Agglutination, und außerdem bilden die Breslaubazillen keine kuppenförmigen Ansiedelungen; endlich waren sie trotz der Zwiespältigkeit des Wachstums auf Gelatine nach der serologischen Prüfung und nach dem Verhalten auf dem Salzagar von Gärtner- und Suipestifer-Bazillen verschieden. Der flache und der kuppenförmige Ansiedelungen bildende Stamm waren serologisch gleich. Es muß sich also um eine besondere Art handeln, und zwar spreche ich sie nach den gleichen Erfahrungen, wie sie Knorr und Braun gemacht haben, als dem Typus Freiburg wahrscheinlich zugehörig an. Der letzte Beweis dafür könnte erst geführt werden, wenn man ein Serum zur Verfügung hätte, das mit einem sicheren Stamm des Typus Freiburg als rein spezifisch im Sinne von Andrewes gewonnen wäre.

Bac. suipestifer (Salmon und Th. Smith)

ist als Krankheitserreger beim Menschen selten nachgewiesen worden, in der neueren Zeit von Braun und Mündel bei einer Speisevergiftung in Offenbach. Demnitz fand ihn in ungeheuren Mengen in mehreren Proben von Rollschinken, auf dessen Genuß mehrere Erkrankungen zurückzuführen waren; aber aus den Stühlen konnten die Erreger nicht gezüchtet werden. Als frischesten einschlägigen Stamm erbat ich den Offenbacher. Auf der Gelatineplatte gingen vorwiegend coli-ähnliche Ansiedelungen auf, ebenso aus einer mit dem Stamm subkutan geimpften Maus, die nach $6\frac{1}{2}$ Tagen gestorben war. Andere dagegen erinnerten in ihrer Zeichnung an die der B-Bazillen (vgl. Fig. 23 und 26 mit Fig. 2 und 3). Fig. 25 stellt 9 Tage alte Ansiedelungen auf Gelatine in natürlicher Größe dar, der Rand ist wallartig. Auf Schräggelatine bildete sich Schleim, der abrutschte; im gefärbten Ausstrich hatten die Stäbchen breite Hüllen wie die Paratyphusbazillen in Fig. 5.

Höss hat zur Unterscheidung von B-, Breslau- und Gärtner-Bazillen das Verhalten in Dulzitbrühe geeignet gefunden, in der der Suipestifer-Bazillus im Gegensatz zu den anderen kein Gas bilden soll; aber Braun und Mündel fanden im Blute eines Kranken unter den Dulzit nicht zersetzenden Stämmen doch einen, der diesen Zucker unter Säure- und Gasbildung zerlegte. Ähnliche Erfahrungen wird man vermutlich mit Glycerin machen. Nach

Lütje u. a. wird die Sternsche Glycerinbrühe mit Fuchsin-Sulfit als Indikator durch die Suipestifer-Bazillen nicht verändert. Das sahen auch wir beim Offenbacher Stamm; die Brühe blieb gelb. Das war aber auch der Fall bei 7 von 19 unserer Paratyphusstämmen, die übrigen 12 wurden blaurot bis rotviolett, von 39 Breslaustämmen blieben 3 eine Zeitlang gelb und wurden dann ziegelrot, die übrigen waren teils ziegelrot, teils blaurot, unsere beiden Stämme (Freiburg?) 48 und 50 ziegelrot, 4 Gärtner-Stämme bordeauxrot. Der Ausfall war also unregelmäßig und unsicher. Immerhin erscheint es wünschenswert, daß künftig bei jedem Suipestifer-Stamm das Verhalten in Glycerin-Stern-Brühe geprüft wird. Sie muß nach der Vorschrift mit Fleischextrakt hergestellt werden; Fleischwasser kann zuckerhaltig sein und gibt dann auch bei Suipestifer-Bazillen Rötung.

Mangels anderer bezeichnender züchterischer Merkmale ist man hauptsächlich auf den Ausfall der Agglutination angewiesen, durch den ja auch Braun und Mündel auf die richtige Fährte geleitet wurden, der es ferner Kopp ermöglichte, einen Dulzit nicht zerlegenden, züchterisch sonst dem Paratyphus B-Bazillus ähnlichen Stamm aus dem Blute eines Kranken als Erreger einer Suipestifer-Infektion zu erkennen.

Zusammenfassung und Schlußbetrachtungen:

Wenn ein Stamm auf der Gelatineplatte nur kuppenförmige Ansiedelungen zeigt, die, solange sie jung sind, bei schwacher Vergrößerung strahlen- oder flammenförmige Zeichnung haben und beim Altern im Innern gleichmäßig undurchsichtig werden, dann liegen Paratyphus B-Bazillen vor.

Sind dagegen coli- oder typhusähnliche Ansiedelungen aufgegangen, die nach einigen Tagen bei schwacher Vergrößerung lehmfarben aussehen, nicht ganz undurchsichtig werden, oft sogar eine der geschilderten und abgebildeten Zeichnungen erkennen lassen, dann wird es sich meist um Breslaubazillen handeln; möglicherweise können auch Bac. enteritidis Gärtner, Freiburg oder Suipestifer in Betracht kommen, Paratyphus B-Bazillen dagegen nur in ganz besonderen Ausnahmefällen.

Sind Ansiedelungen beider Sorten, kuppen- und coli-ähnliche, in einer Reinzucht vorhanden, dann wird man auf Bac. enteritidis Gärtner, Freiburg oder Suipestifer schließen.

Kuppenformen dieser drei Arten können von der Gelatineplatte auf schräg erstarrte Gelatine übertragen, Schleim bilden, der abrutscht, und zeigen dann im gefärbten Ausstrich Stäbchen mit Hüllen (Kapseln) wie die Paratyphus B-Bazillen.

Da die genannten Zeichen wesentlich ausgesprochener und eindrucksvoller sind als eine vorhandene oder fehlende Wallbildung und andere Züchtungsmerkmale auf Agar mit gewissen Zusammensetzungen, muß man verlangen, daß die aus Stuhl, Blut, Organen oder verdächtigen Nahrungsmitteln gezüchteten Bakterien der genannten Arten außer mit den bisherigen Verfahren einschließlich der Agglutination in jedem Falle auf Gelatine, und zwar nicht bloß auf schräg erstarrter, sondern insbesondere auch auf Gelatineplatten weiter gezüchtet und beobachtet werden, und daß das Wachstum und das Verhalten der Ansiedelungen auf der Gelatineplatte mit bloßem Auge und unter dem Mikroskop an mehreren Tagen verfolgt wird. Da ferner die Agglutination, wenigstens die nicht mit monospezifischen Seren (im Sinne von Andrewes) angestellte, selbst für die Unterscheidung zwischen Paratyphus- und Breslaubazillen nicht immer eindeutig ausfällt, und überhaupt als alleiniges Verfahren angewendet, schon zu verwirrenden Ergebnissen geführt hat, darf man auf die Züchtungsverfahren und gerade auf die Hinzunahme

der Gelatineplatte nicht verzichten, durch diese wird die Entscheidung wesentlich sicherer, ohne daß mit ihr eine nennenswerte Mühe oder eine Verzögerung der Abgabe des Befundes verbunden ist.

Hat Rimpau seinerzeit (1912) empfohlen, wegen der Unzuverlässigkeit der Agglutinationsreaktion auf die züchterischen Merkmale wieder mehr Gewicht zu legen, so kann man heute sagen, daß allein schon die Gelatineplatte der Agglutination überlegen ist, wenn zwischen Typhus- und Paratyphusbazillen einerseits und zwischen Paratyphus B- und Breslaubazillen andererseits unterschieden werden soll. Es wird deshalb nötig sein, daß in den Anweisungen für die bakteriologische Fleischschau und somit auch in der preußischen Ministerialentschließung, Runderlaß vom 23. 5. 1927, Reichs-Gesundheitsblatt 1927, S. 564, insbesondere in dem Formblatt V (S. 567) „Ergebnis der Kulturprüfung“ und in den Erlassen der übrigen Bundesstaaten das Gelatineplattenverfahren nachträglich noch aufgeführt und damit verlangt wird. Denn wenn auch für die Ermittlung der einzelnen Arten der Nahrungsmittelvergifter die serologische Prüfung den Ausschlag gibt, darf doch die Gelatineplatte neben den übrigen Züchtungsverfahren nicht außer acht gelassen werden.

Das gilt weiterhin für andere Bakterien, die bei Zimmerwärme mit bezeichnenden Ansiedelungen wachsen, z. B. für *Bac. pyocyaneus* und *Bac. fluorescens liquefaciens*, die sich außer durch ihre verschiedene Begeißelung schon durch das Aussehen ihrer Ansiedelungen auf der Gelatineplatte auseinander halten lassen. Dresel und Stickl haben neuerdings aus Harn von Typhuskranken auf der Agarplatte braun wachsende Ansiedelungen gezüchtet, die sich bei weiterer Verfolgung tatsächlich als regelrechte Typhusbazillen erwiesen. Wie es früher als unstatthaft angesehen worden wäre, wenn jemand gerade bei der Untersuchung auf diese Keime die Gelatineplatte vernachlässigt hätte, so muß das auch heute noch gelten. Zur Unterstützung des Gedächtnisses und als Beleg für das Aussehen der Ansiedelungen ist die Festhaltung im Lichtbild kaum zu entbehren. Denn auch die beste Beschreibung ist nicht imstande, dieses Beweisstück zu ersetzen.

Hätte man die Gelatineplatte nicht zu Unrecht in den letzten 3 Jahrzehnten so gut wie vergessen, dann wären viele Meinungsverschiedenheiten auf dem hier behandelten Gebiete vermieden worden, auch hätte die Ansicht von der Einheitlichkeit, die Schottmüller auffallenderweise bei den Paratyphus- und Enteritisbakterien annimmt, während er sie doch bei den Streptokokken bestimmt ablehnt, wie sie ferner Uhlenhuth, Seiffert und andere vertreten, nicht so leicht und so viele Anhänger gewinnen können.

Schlußsätze.

1) Der *Bac. paratyphi* B ist ein gut gekennzeichneter Erreger der menschlichen Erkrankung. Die Erreger der bis jetzt bekannten Fleisch- und Nahrungsmittelvergiftungen sind von ihm verschieden und dürfen nicht als Paratyphusbazillen bezeichnet werden. — 2) Als hier einschlägige Fleisch- und Nahrungsmittelvergifter sind bis jetzt in der menschlichen Pathologie vier bekannt, die beschrieben werden: *Bac. enteritidis* Breslau oder *Bac. breslaviensis*, *Bac. enteritidis* Gärtner, ein anderer *Bac. enteritidis* (Freiburg?) und *Bac. suipestifer*. 3) Das Gelatineplattenverfahren nach Robert Koch ist das geeignetste züchterische Mittel für die Unterscheidung der Paratyphus B- von den Enteritisbakterien, insbesondere von den Breslaubazillen. Es ist hier sogar der Agglutination überlegen. Für die Unterscheidung der Enteritis-

und der Suipestifer-Bakterien unter sich ist es zwar nicht ebenso ausschlaggebend, es muß aber auch bei diesen Untersuchungen stets angewendet werden. — 4) Für die Herstellung der Nährgelatine, namentlich des Grades der aktuellen und potentiellen Reaktion werden Anweisungen gegeben und die Verfahren zur Ermittlung der Wasserstoffionenkonzentration beurteilt. — 5) Die auf den Gelatineplatten wachsenden Ansiedelungen sind nicht nur mit bloßem Auge anzusehen, sie müssen auch unter dem Mikroskop bei schwacher Vergrößerung besichtigt und in ihrer fortschreitenden Entwicklung beobachtet werden. Die dazu geeigneten Systeme und einige Gesichtspunkte für die Herstellung mikrophotographischer Aufnahmen werden besprochen.

Erklärung der Tafelabbildungen.

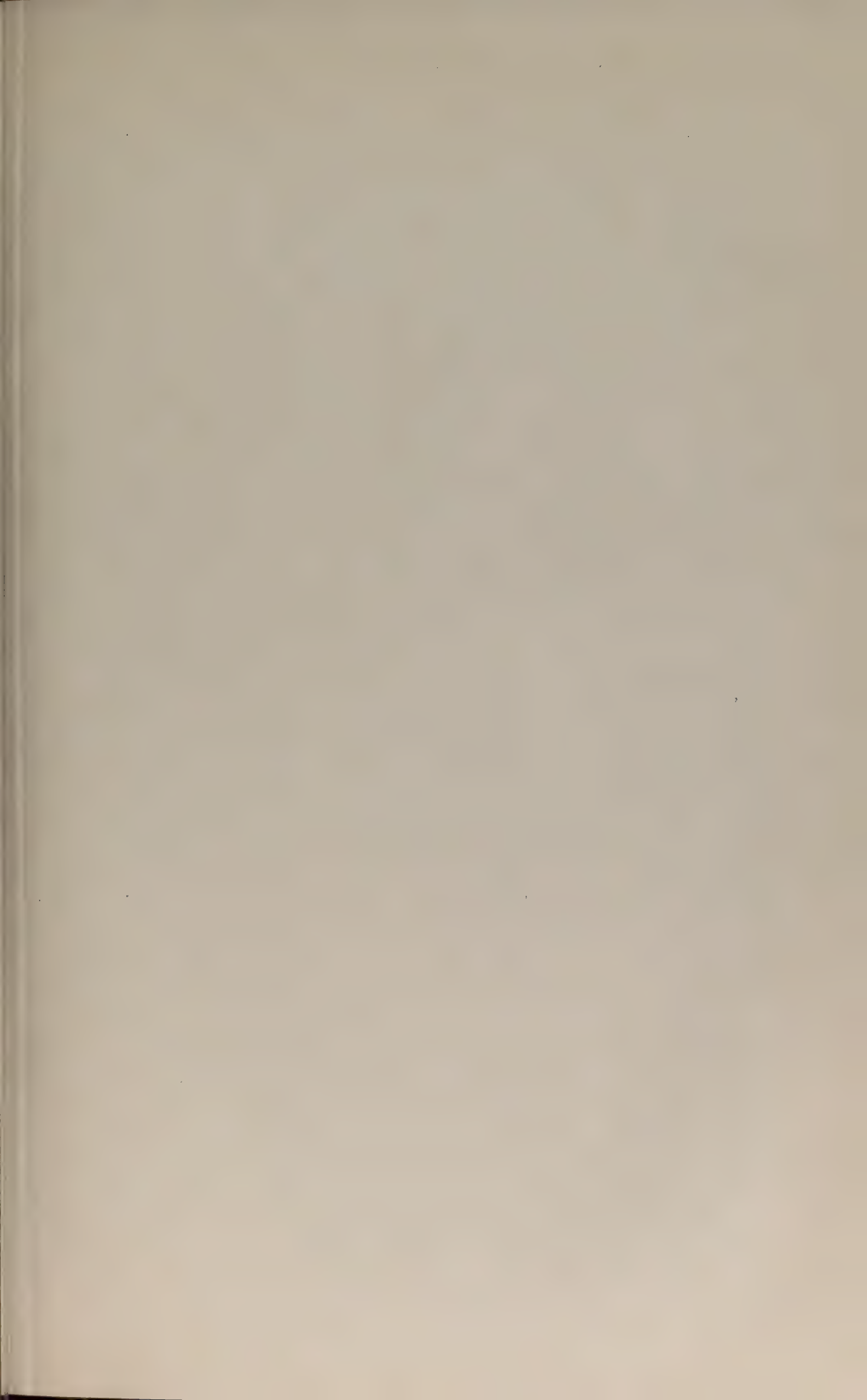
Von den in Klammern beigesetzten Zahlen bedeutet die erste das Objektiv, z. B. (aa 6), die zweite das Projektionsokular, z. B. (IV), die dritte die Entfernung der Mattscheibe vom Objektisch des Mikroskops in Zentimeter.

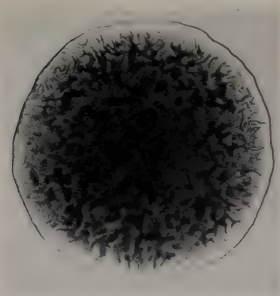
- Fig. 1. Paratyphus B. 43½ Std. 35× (aa 6. IV. 50 cm).
 Fig. 2. Paratyphus B. 41 Std. 35× (aa 6. IV. 50 cm).
 Fig. 3. Paratyphus B. 68 Std. 20× (aa 6. IV. 38½ cm).
 Fig. 4. Paratyphus B aus Maus. 50 Std. 35× (aa 6. IV. 50 cm).
 Fig. 5. Paratyphus B. 4 Tage auf Schräggelatine. 1000× (Apochr. 3 mm. IV. 103 cm).
 Fig. 6. Breslau. Wie Fig. 5.
 Fig. 7. Paratyphus B. 6¾ Tage. 1× (Anastigmat 210 mm).
 Fig. 8. Breslau. 5 Tage. Wie Fig. 7.
 Fig. 9. Paratyphus B. 4 Tage. 3× (Proj. System 70 mm; ohne Okular. 42 cm).
 Fig. 10. Breslau. 5 Tage. 3×, wie Fig. 9.
 Fig. 11. Typhus. 4 Tage. 3×, wie Fig. 9.
 Fig. 12. Breslau. 3 Tage. 20× (aa 6. IV. 38½ cm). Vgl. Fig. 14.
 Fig. 13. Freiburg (?). 5 Tage. 7× (Proj. Syst. 70 mm; ohne Okular. 71 cm).
 Fig. 14. Breslau. 3 Tage. Die gleiche Ansiedelung wie Fig. 12. 19× (Proj. System 35 mm. IV. 52 cm).
 Fig. 15. Breslau aus Maus. 3 Tage. 25× (aa 6. IV. 42 cm).
 Fig. 16. Breslau aus Stuhl (Mundenheim). 5½ Tage. 25× (aa 6. IV. 42 cm).
 Fig. 17. Breslau aus Maus. 6¼ Tage. 15× (aa 6. II. 46 cm).
 Fig. 18. Freiburg (?) aus Maus. 3½ Tage. 20× (aa 6. IV. 38½ cm).
 Fig. 19. Breslau. 5½ Tage. 20× (aa 6. IV. 38½ cm).
 Fig. 20. Gärtner (Potsdam). 45 Std. 25× (aa 6. IV. 42½ cm).
 Fig. 21. Gärtner (Potsdam). 48 Std. 35× (aa 6. IV. 50 cm).
 Fig. 22. Gärtner (Potsdam). 5 Tage. 15× (aa 6. II. 46 cm).
 Fig. 23. Suipestifer (Offenbach). 51 Std. 25× (aa 6. IV. 42½ cm).
 Fig. 24. Gärtner (Potsdam). 71 Std. 20× (aa 6. IV. 38½ cm).
 Fig. 25. Suipestifer (Offenbach). 9 Tage. 1× (Anastigmat 210 mm).
 Fig. 26. Suipestifer (Offenbach). Die gleiche Ansiedelung wie Fig. 23, jetzt 3 Tage alt. 20× (aa 6. IV. 38½ cm).

Schrifttum.

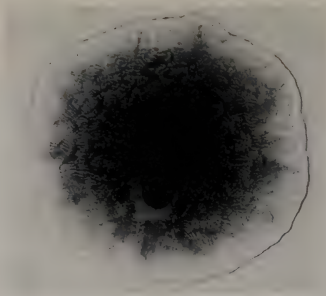
C. f. B. = Centralblatt für Bakteriologie, I. Abteilung. Originale.
 C. f. B. Ref. = Centralblatt für Bakteriologie, I. Abteilung. Referate.
 W. = Wochenschrift. Z. = Zeitschrift.

Andrewes, F. W., siehe bei Kauffmann, Fritz, Z. f. Hyg. Bd. 108. 1928. S. 411. — Aoki, K., und Hayashi, T., Z. f. Immunitätsf. Bd. 51. 1927. S. 435. — Barth, Erich, 1) C. f. B. Ref. Bd. 81. 1926. S. 297. 2) Münch. med. W. Ref. 1926. Nr. 22. S. 932. 3) Med. Klinik. 1927. Nr. 38. S. 1445. — Bitter, Ludwig, 1) C. f. B. Bd. 85. 1921. S. 110 und Beiheft S. 68. 2) C. f. B. Bd. 88. 1922. S. 435. 3) Dtsch. med. W. Nr. 6. 1925. S. 226. 4) C. f. B. Bd. 97. 1926. Beih. S. 320. — Bitter, L., und Holtz, H., Arch. f. wiss. u. prakt. Tierhkd. Bd. 50. 1923. S. 129. — Bitter, L., Weigmann, F., und Habs, H., Münch. med. W. 1926. Nr. 23. S. 940. — Braun, H., u. Mündel, Fr., Klin. W. 1927. Nr. 27. S. 1286. — Brinck, Joachim, C. f. B. Bd. 104. 1927. S. 304. — Conradi, H., Drigalski, W. v., u. Jürgens, G., Z. f. Hyg. Bd. 42. 1903. S. 141. — Demnitz, Albert,





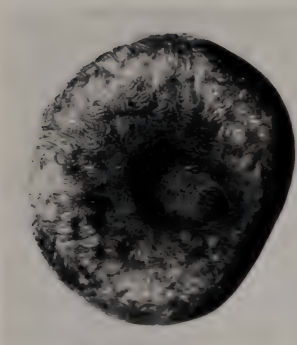
1



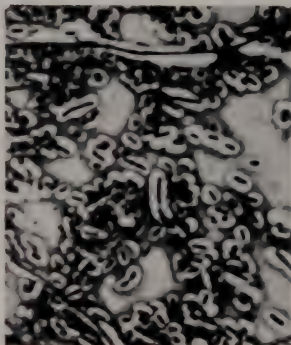
2



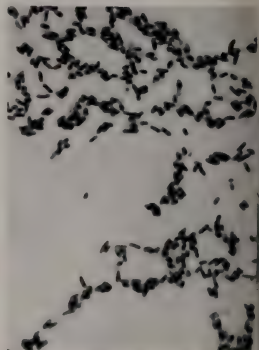
3



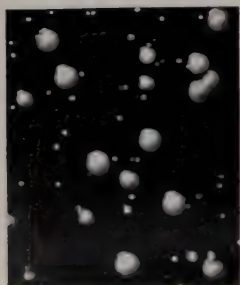
4



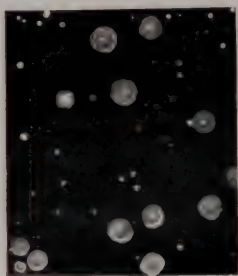
5



6



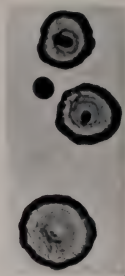
7



8



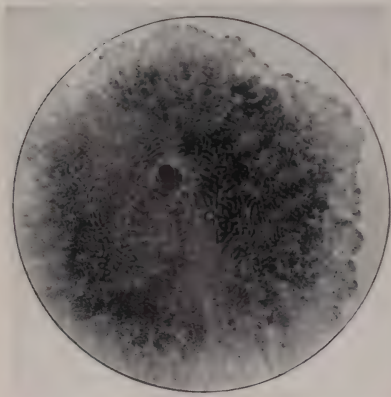
9



10



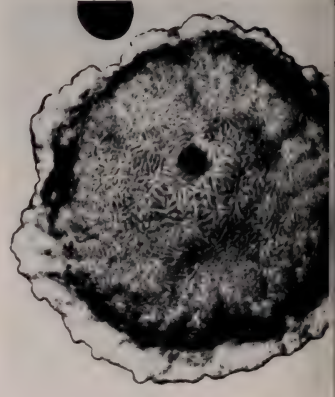
11



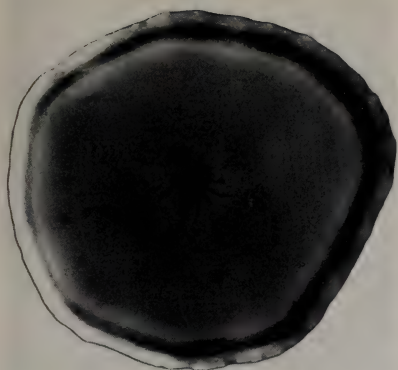
12



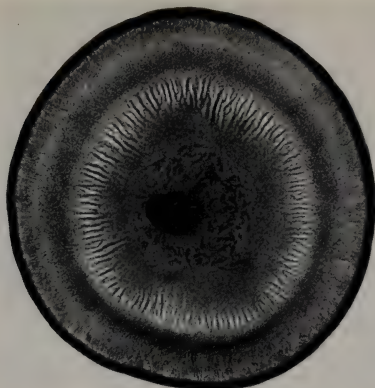
13



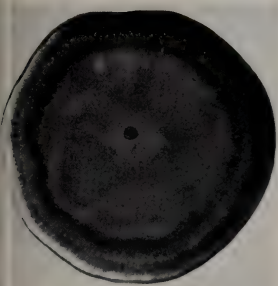
14



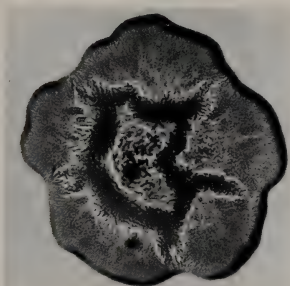
15



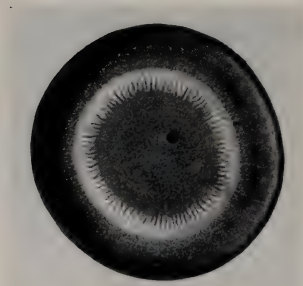
16



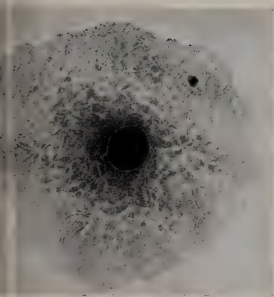
17



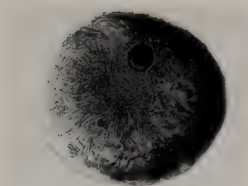
18



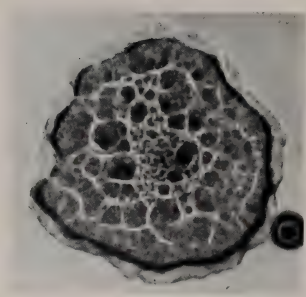
19



20



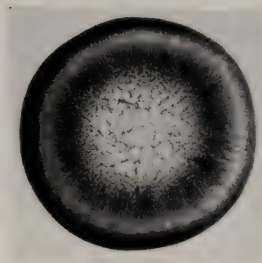
21



22



23



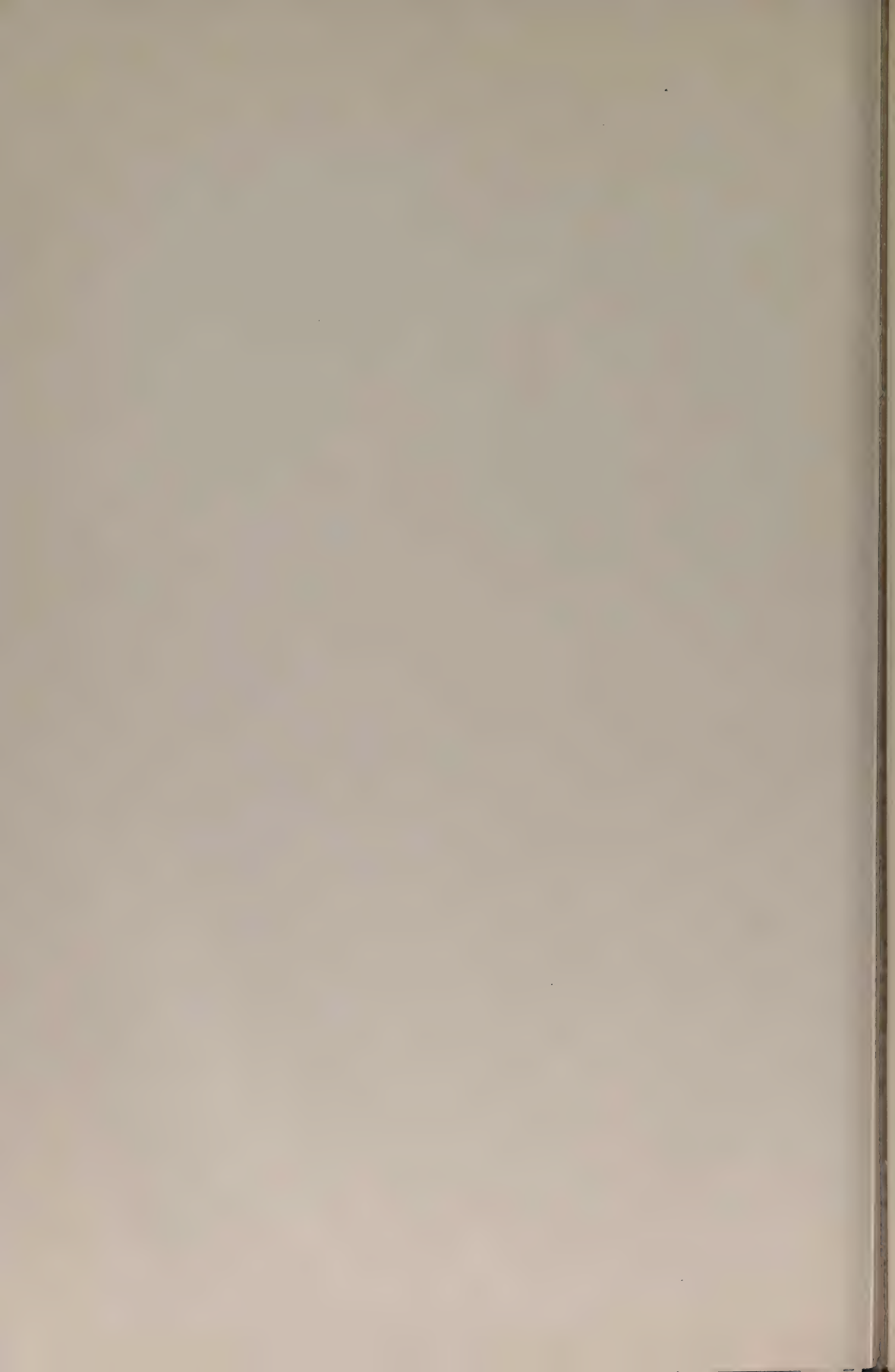
24



25



26



Dtsch. tierärztl. W. 1926. Nr. 19. S. 345. — Dresel, E. G., u. Stickl, O., Dtsch. med. W. 1928. Nr. 13. S. 517. — Drigalski, W. v., Festschr. zum 60. Geburtstage von Robert Koch. 1903. S. 409. — Elkeles, Gerhard, 1) C. f. B. Bd. 98. 1926. S. 326. 2) Klin. W. 1926. Nr. 34. S. 1570. 3) Münch. med. W. 1928. Nr. 13. S. 561. 4) C. f. B. Bd. 106. 1928. S. 41. — Fischer, Bernhard, 1) Z. f. Hyg. Bd. 39. 1902. S. 447. 2) Klin. Jahrb. Bd. 15. 1906. S. 61. — Gärtner, August, Correspondenzbl. des allg. ärztl. Vereins von Thüringen 1888. Nr. 9; abgedruckt in der Breslauer ärztl. Z. 1888. Nr. 21—24. — Gärtner, Wolf, C. f. B. Bd. 87. 1922. S. 486. — Graetz, Fr., C. f. B. Bd. 97. 1926. Beih. S. 279. — Gundel, M., C. f. B. Bd. 98. 1926. S. 444. — Heim, Ludwig, 1) Arch. f. Hyg. Bd. 40. 1901. S. 55. 2) Münch. med. W. 1919. Nr. 49. S. 1399. 3) Lehrbuch der Bakteriologie. 6./7. Aufl. Stuttgart, Ferd. Enke, 1922. 4) Blätter für Untersuchungs- u. Forschungs-Instrumente i. A. der Emil Busch A.-G., Optische Industrie, Rathenow, herausgegeben v. F. Hauser. 2. Jahrg. Juni 1928. S. 44. — Hohn, Joseph, und Becker, Paul, C. f. B. Bd. 103. 1927. S. 184. — Höss, Ferd., Exp. Untersuchungen zur Systematik der Paratyphusbazillenarten. Dissertation. Frankfurt a. M. 1927. — Kaensche, C., Z. f. Hyg. Bd. 22. 1886. S. 53. — Knorr, Maximilian, 1) C. f. B. Bd. 97. 1926. Beih. S. 328. 2) C. f. B. Bd. 99. 1926. S. 25. 3) C. f. B. Bd. 99. 1926. S. 576. 4) C. f. B. Bd. 101. 1927. S. 482. — Knorr, M., u. Braun, A., C. f. B. Bd. 105. 1927/28. S. 173. — Kopp, R., Dtsch. med. W., 1926. Nr. 51. S. 2156. — Lehr, Erich, Berl. tierärztl. W. 1927. Nr. 17. S. 274. 2) C. f. B. Bd. 107. 1928. S. 69. — Leonhardt, C. f. B. Bd. 104. 1927. S. 334. — Löffler, E., Z. f. Immunitätsf. Bd. 52. 1927. S. 124. — Lütje, 1) C. f. B. Ref. Bd. 84. 1927. S. 77. 2) Ebenda. S. 522. — Mießner, H., C. f. B. Bd. 97. 1926. Beih. S. 242. — Müller, Reiner, 1) Dtsch. med. W. 1910. Nr. 51. S. 2387. 2) C. f. B. Bd. 95. 1925. S. 147. — Pesch, Karl L., u. Maschke, A., Klin. W. 1928. Nr. 9. S. 401. — Rimpau, W., Arch. f. Hyg. Bd. 76. 1912. S. 313. — Rother, Wilhelm, C. f. B. Bd. 88. 1922. S. 560 und Bd. 90. 1923. S. 20. — Savage, W. G., and White, P. B., kritisch ref. von Manteufel, C. f. B. Bd. 79. 1925. S. 213. — Schottmüller, Hugo, C. f. B. Bd. 97. 1926. Beih. S. 329. — Seiffert, Walter, Münch. med. W. 1927. Nr. 11 u. 12. S. 445 u. 501. — Standfuß, Richard, Bakteriologische Fleischbeschau. Berlin, Rich. Schoetz, 1922. — Stern, Wilhelm, C. f. B. Bd. 78. 1916. S. 481 und Bd. 82. 1918. S. 49. — Uhlenhuth, Paul, 1) C. f. B. Bd. 97. 1926. Beih. S. 219. 2) Klin. W. Ref. 1927. Nr. 9. S. 425. — Uhlenhuth, P., u. Seiffert, W., Dtsch. med. W. 1926. Nr. 16—18. S. 650, 689 u. 737. — Weichardt, Wolfgang, Med. Welt. 1927. Nr. 9 u. 10. S. 321 u. 361.

Nachdruck verboten.

[Aus dem Tierseucheninstitut der Universität Leipzig (Direktor: Prof. Dr. A. Eber).]

Zur Frage der Reinzüchtung der Tuberkelbazillen.

Von Dr. Stefania Lichtenstein.

Im Laufe gewisser Tuberkuloseuntersuchungen ergab sich die Notwendigkeit, Tuberkelbazillenkulturen verschiedener Herkunft zu verwenden. Als Ausgangsmaterial kamen in Betracht: 24 Sputa, davon mikroskopisch negativ 3, positiv 21. Ferner Organe kranker Tiere: Rind, Kaninchen, Meerschweinchen, Hühner, Frosch. Neben der Uhlenhuthschen Antiforminmethode wurden das Verfahren von Löwenstein und Sumiyoski nebst der Hohnschen Modifikation angewandt, um aus dem tuberkulösen Material den Tuberkelbazillus zu züchten und Reinkulturen zu gewinnen.

Als Nährböden benutzte ich neben dem Nährboden von Petraghani (s. weiter unten) mit und ohne Malachitgrün am Anfang auch Loeffler-Serum, Petroff, Dorset, Lubenau, sowie den Lubenauschen Nährboden nach Angaben von Hohn. Nachdem sich aber ergeben hatte, daß der Petroffsche Nährboden ganz ungeeignet ist, und die Eiernährböden von Lubenau, Hohn, Dorset dem Petraghani-Nährböden entschieden unterlegen sind, beschränkte

ich mich weiterhin auf die Verwendung des letztgenannten Nährbodens. — Ueber gute Erfolge mit dem Petragnani-Nährboden im Gegensatz zum Petroffschen Nährboden berichtet Blechmann.

Das mit Antiformin vorbehandelte Material wurde, außer auf den eben genannten Nährböden, auch auf Glycerinagar ausgestrichen. Das Antiforminverfahren, entschieden das beste für den mikroskopischen Nachweis der Tuberkelbazillen, hat sich in meinen Versuchen für das Herauszüchten der Tuberkelbazillen wenig bewährt. Auch wenn die Einwirkungsdauer des Antiformins 10 Min. betrug und darunter, waren die meisten Züchtungsergebnisse negativ. Da aber auch die Löwenstein-Sumiyoshische und sogar die Hohnsche, Methode verschiedentlich versagten, trotzdem nach der mikroskopischen Prüfung des Ausgangsmaterials ein positives Ergebnis zu erwarten war, suchte ich die Schwefelsäure durch ein anderes Reagens zu ersetzen. Als solches hat sich eine 10proz. Salzsäurelösung aufs glänzendste bewährt. Sumiyoshi hat bereits bei seinen Versuchen 10proz. Salzsäure verwendet. Er legte die Kulturen auf Glycerinkartoffel an. Unter gleichen Bedingungen erwies sich indessen die Vorbehandlung mit Schwefelsäure durchaus als zweckmäßiger.

Methodik: eine beliebige Menge des Materials, — ich arbeitete aus praktischen Gründen nur mit kleinen Mengen. Es wurden also von Sputum 1—2 ccm, von zerdrücktem oder in einer Reibschale zerriebenem Organmaterial u. dgl. mehrere Platinspatel, auf den Boden eines weiten Zentrifugenröhrchens gebracht und mit 10 ccm einer 10proz. Salzsäurelösung überschüttet. Das zu untersuchende Material wird sodann mit einem kräftigen Platinspatel an der Wand des Röhrchens und in der Flüssigkeit gründlich verrieben und verrührt. Ist das Material sehr fein, so genügt es, das Röhrchen zwischendurch zu schütteln; nur soll ein allzukräftiges Schütteln, bei dem einzelne Teilchen an der Wand des Röhrchens außerhalb der Salzsäure hängen bleiben, vermieden werden. Nach 10 Min. langem Umrühren und Schütteln (nicht länger) wird das Röhrchen 10—15 Min. lang zentrifugiert (3000 Umdrehungen pro 1 Min.). Darauf wird die über dem Bodensatz stehende Flüssigkeit abgegossen, das Röhrchen umgekippt, so daß die letzten Flüssigkeitstropfen mit Filtrierpapier möglichst aufgenommen werden können. Von dem Bodensatz werden sofort Kulturen angelegt. Für das Ergebnis der Kulturmethode ist der Nährboden entscheidend. Als idealer Nährboden erwies sich der eingangs genannte Nährboden von Petragnani. Ich wählte diesen Nährboden, weil er mir der Zusammensetzung nach für die Reinzüchtung der Tuberkelbazillen sehr geeignet zu sein schien. Der Nährboden wird nach Petragnani, wie folgt, hergestellt. Zu 150 ccm Milch werden 6 g Kartoffelmehl, 1 g Pepton und eine eigroße, in Stücke geschnittene Kartoffel zugesetzt. Das ganze wird 10 Min. lang in kochendem Wasserbade unter ständigem Schütteln gehalten, bis Verkleisterung eingetreten ist, und dann 1 weitere Std. im Wasserbade gelassen. Nach Abkühlen auf 50° setzt man 4 ganze Eier, 1 Eigelb, 12 ccm Glycerin und 10 ccm einer 2proz. Lösung von Malachitgrün Höchst hinzu, schüttelt kräftig und filtriert durch Gaze. Hierauf wird auf Röhrchen abgefüllt und wie Loeffler-Serum im Erstarrungsapparat sterilisiert, und zwar am 1. Tage 20 Min. bei 80°, am 2. und 3. je 15 Min. bei 75°.

Der Petragnani-Nährboden hat sich den anderen, von mir gebrauchten Nährböden bei weitem als überlegen erwiesen. Das Malachitgrün hemmt das Wachstum der eventuell noch nicht abgetöteten Begleitbakterien, nicht aber die Entwicklung der Tuberkelbazillen. Das gleiche Material aus Froschorganen auf Petragnani-Röhrchen und auf Glycerinagar ausgestrichen, entwickelte sich auf dem Petragnani-Nährboden zur Reinkultur von Froschtuberkelbazillen, während auf dem Glycerinagar das Begleitbakterium die ganze Ober-

fläche des Schrägagars überwucherte. Dieser Wirkung des Malachitgrüns ist es wohl zu verdanken, daß man bei der Isolierung der schwerer züchtbaren Rindertuberkelbazillen die Einwirkungsdauer der Salzsäure von 10 Min. auf 6 Min. reduzieren kann. Auch für die Froschtuberkelbazillen ist eine Vorbehandlungsdauer von weniger als 10 Min. angezeigt.

Mit der Salzsäurevorbehandlung und dem Petraghani-Nährboden hatte ich bei meinen Versuchen keine negativen Ergebnisse zu verzeichnen¹⁾. Was die Zeit betrifft, bis das erste Wachstum zu sehen war, so konnte schon nach 8, 10, 14 und 19 Tagen, in einzelnen Fällen aber auch erst nach 27 und sogar nach 31 Tagen deutliches Wachstum festgestellt werden. Zweckmäßig ist es jedesmal, das Material auf 4—5 Röhrchen auszustreichen.

Auf dem grünen Petraghani-Nährboden erscheinen die Tuberkelbazillenkulturen hellgelb gefärbt. Dieser Farbenkontrast ermöglicht, bereits den allerfrühesten Wachstumsanfang festzustellen, was auf den Eiernährböden weniger leicht ist. Die verschiedenen Typen der Tuberkelbazillen wachsen auf dem Petraghani-Nährboden außerordentlich üppig, so daß dieser Nährboden auch zum Ueberimpfen von Reinkulturen sich sehr gut eignet. Ein weiterer Vorteil dieses Nährbodens ist die reichliche Bildung von Kondenswasser, so daß ein künstlicher Zusatz, wie ihn Hohn für den Eiernährboden empfiehlt, nicht erforderlich ist. Um übrigens die Röhrchen auch während eines längeren Aufenthalts im Brutschrank vor dem Austrocknen zu schützen und das Verschließen mit Paraffin zu vermeiden, stelle ich die Kulturröhrchen nicht in Wassergläser, sondern in hohe Gläser mit eingeschlifffenem Deckel. In den gut abgeschlossenen Gläsern behalten die Kulturröhrchen im Brutschrank wochenlang ihr Kondenswasser.

Literatur.

Löwenstein, Wien. klin. Wochenschr. 1925. Nr. 29. 1927. Nr. 5. — Sumiyoshi, Ztschr. f. Tuberk. Bd. 39. 1924. Bd. 40. — Hohn, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 98. 1926. — Ders., Münch. med. Wochenschr. 1926. Nr. 15. 51. — Petraghani, Boll. dell'istit. sieroterop. Milanese. Vol. 5. 1926. H. 3; Ref. im Zentralbl. f. d. ges. Tuberkuloseforsch. Bd. 26. 1927. — Blechmann, Compt. rend. Soc. de Biol. Vol. 96. 1927. Nr. 13. — Seelemann u. Klingmüller, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 104. 1927.

Nachdruck verboten.

Ueber Staphylokokkenfermente.

[Aus dem Institut für experimentelle Therapie „Emil v. Behring“ Marburg/L.
(Leiter: Priv.-Doz. Dr. H. Schmidt).]

Von Dr. med. **Hans Groß.**

Die Einteilung der Staphylokokken in pathogene und saprophytische Stämme besteht unseres Erachtens nur dann zu Recht, wenn man der Ansicht ist, daß es sich hierbei um 2 große Gruppen mit konstanten Artmerkmalen handelt. Vertritt man dagegen die allgemein verbreitete Vorstellung, daß die

1) Schon nach der Abfassung dieser Mitteilung wurde ich auf die Abhandlung von Seelemann und Klingmüller aufmerksam gemacht. Diese Autoren haben neben der Schwefelsäure mit 10, 12 und 15proz. Salzsäure gearbeitet. Als Nährboden wurde der Lubenausche Eiernährboden benutzt. Seelemann und Klingmüller erklären „auf Grund von Beobachtungen in einzelnen Versuchen der HCl vor der H₂SO₄ den Vorzug geben zu müssen“.

Infektion mit Staphylokokken dadurch zustande kommt, daß die ubiquitären Keime bei besonders disponierten Individuen pathogene Eigenschaften annehmen, dann ist obiges Einteilungsprinzip a priori unhaltbar. Dold kam auf Grund seiner tierexperimentellen Untersuchungen, die er mit einer Anzahl von Staphylokokkenkulturen verschiedener Herkunft bei Kaninchen und Meerschweinchen anstellte, zu dem Ergebnis, daß gewisse Staphylokokkenerkrankungen durch besonders geartete (toxische) Typen hervorgerufen würden. Darányi teilt die Staphylokokken nach ihren biologischen Eigenschaften in 3 Gruppen: 1) fermentlose, saprophytische Staphylokokken, 2) fermentbildende, saprophytische Staphylokokken und 3) parasitische Staphylokokken, welche außer anderen Fermentwirkungen auch das Zitratblut koagulieren und bei Kaninchen Eiterung in 2—4 Tagen verursachen. Eine Infektion soll nach Ansicht von Darányi demnach auf zweierlei Weise geschehen können: Entweder exogen durch Eiter (Staphylokokken der 3. Gruppe) oder öfters endogen durch die Hautstaphylokokken der 2. Gruppe. Die letzteren aber sollen nicht primär pathogen sein, sondern die eitererregenden Eigenschaften nur bei Gewebsdisposition (nekrotisches oder nekrobiotisches Gewebe) erlangen. In diesem Falle sollen sie außer einer Virulenzsteigerung auch gewisse biologische Umwandlungen durchmachen, z. B. die neu erworbene Eigenschaft der Zitratblutgerinnung.

Neißer bezeichnet neuerdings die pathogenen Aureus-Staphylokokken als Pyokokken und versteht darunter Staphylokokkenstämme, die möglichst aus akuten, größeren menschlichen Krankheitsherden stammen, ein kleineres, rundes Korn von gleichmäßiger Größe zeigen, einen orangegelben Farbstoff bilden, Gelatine verflüssigen, aërob und anaërob wachsen, Plasma koagulieren, Hämolsin bilden, durch ein spezifisches Pyokokkenserum stark agglutiniert werden und sich im Tierversuch als pathogen erweisen. Im Gegensatz hierzu werden die unzweifelhaft saprophytischen Staphylokokken Saprokokken genannt.

Wie man sich auch zu den verschiedenen Einteilungen stellen mag, fest steht jedenfalls die Tatsache, daß die aus akuten Eiterungsprozessen gezüchteten Staphylokokken eine ausgeprägte Gleichmäßigkeit in ihren mikroskopischen, kulturellen, fermentativen und tierpathogenen Eigenschaften zeigen, die den sogenannten saprophytischen Stämmen fehlen. Auf Grund früherer Versuche über Virulenz und Pathogenität der Staphylokokken fand H. Groß als charakteristische Merkmale der Pyokokken und als geeignete und brauchbare Virulenzprüfungsmethoden von den Fermentreaktionen die Plasmagerinnung, Hämolyse und Gelatineverflüssigung und als biologische Prüfungsmethode (Tierversuch) die von Dold angegebene Intrakutanmethode bei Kaninchen und Meerschweinchen, da diese Reaktionen am besten mit der klinischen Pathogenität übereinstimmen und auch in relativ kurzer Zeit ein Urteil ermöglichen.

Wir haben uns nun seit längerer Zeit mit Untersuchungen über Staphylokokkenfermente beschäftigt, deren Ergebnisse im folgenden mitgeteilt werden sollen. Von den Fermenten der Staphylokokken sind besonders das Staphylolysin, tryptische Fermente, die Gelatinase, das Labferment und die Staphylokinase von Wichtigkeit.

Das Hämolsin der Staphylokokken ist charakterisiert durch seine blutlösende Wirkung gegenüber Kaninchenerythrozyten, die am stärksten beeinflußt werden, durch seine Inaktivierbarkeit bei 56° C und durch die Neutralisierung mit Hilfe eines spezifischen Antilysins. Zum Nachweis des Staphylolysins bedienen wir uns der üblichen Methoden und zwar 1) der Platten-, hämolyse, 2) des Ausschüttelungsverfahrens nach Oppenheimer und 3) der von Neißer und Wechsberg angegebenen Filtrathämolyse. Für die Platten-

hämolyse wurden von uns Agarplatten mit einem verschiedenprozentigen (1, 2,5 und 5 Proz.) Zusatz von Kaninchen-, Menschen- und Pferdeblut benutzt. Es wurde eine größere Anzahl pyogener und saprophytischer Stämme untersucht und lediglich die Befunde nach 24stünd. Brutschrankaufenthalt bei 37° C berücksichtigt und bewertet. Kaninchenblut war am leichtesten, Menschen- und Pferdeblut waren schwerer hämolysierbar. Hierauf wurde bereits früher schon von Darányi und H. Groß hingewiesen. Alle von uns untersuchten Pyokokken zeigten im Gegensatz zu den saprophytischen Stämmen auf der 2½ und 5proz. Kaninchenblutplatte Hämolyse mit graduellem Unterschied (+ bis +++++). Auf der 2½ und 5proz. Menschen- und Pferdeblutagarplatte war die Hämolyse schwächer, und einige Stämme zeigten nach 24stünd. Bebrütung bei 37° C einen negativen Befund, während gegenüber Kaninchenblut Hämolyse beobachtet wurde.

Dieselben Staphylokokkenstämme wurden dann nach der Methode von Oppenheimer untersucht, die darin besteht, daß 24 Std. alte Agarröhrchen oder Kolle-Schalenagarkulturen mit einer bestimmten Menge (4 bzw. 10 cem) Kochsalzlösung abgeschwemmt werden. Nach 1stünd. Stehen bei Zimmertemperatur wird scharf zentrifugiert und die überstehende Waschflüssigkeit auf ihren Hämolysingehalt untersucht. Es fand sich im großen und ganzen eine gute Uebereinstimmung der Befunde der Plattenhämolyse mit denen der Ausschüttelungsmethode, jedoch wurde in einigen Fällen eine schwache Plattenhämolyse bei einem negativen Lysinbefund in der Waschflüssigkeit festgestellt. Von einigen stark fermentbildenden Staphylokokken zeigten noch 0,025 cem Waschflüssigkeit komplette Hämolyse.

Weiterhin untersuchten wir die keimfrei filtrierten Staphylokokkenbouillonkulturen auf ihren Hämolysingehalt in der von Neißer und Wechsberg angegebenen Weise. Die hierzu benutzte Bouillon wurde nach den Angaben von Neißer mit n. Natron- und n. Kalilauge (ää). neutralisiert und alkalisiert, und zwar so, daß ½ derjenigen Menge des Laugengemisches zugesetzt wurde, welches zum Rotumschlag für Phenolphthalein nötig gewesen wäre. Vom 5. Tage ab war zumeist das Hämolysin in den Filtraten nachweisbar und nahm dann an Menge progredient zu. Am stärksten war der Hämolysingehalt zwischen dem 9. und 11. Tag. Die Bouillonkulturen wurden durch Seitz-Filter filtriert. Von der aktivierenden Eigenschaft des Peptons auf die Hämolysinbildung, worauf besonders von Walbum hingewiesen wurde, konnten wir uns nur in einigen Fällen überzeugen. In Bouillon mit 5proz. Peptonzusatz war das Staphylolysin früher nachweisbar und die Bildung desselben verlief in den folgenden Tagen intensiver als in Bouillon mit einem 1proz. Peptonzusatz.

Wie J. Koch so fanden auch wir einen weitgehenden Parallelismus zwischen Filtrat- und Plattenhämolyse. Der Nachweis des Staphylolysins gelingt in einfachster und raschester Weise mit Hilfe des Plattenverfahrens, für genauere Untersuchungen bedarf es jedoch der Nachprüfung durch die Filtrat- oder Ausschüttelungshämolyse.

Die eiweißlösende Wirkung der Staphylokokken untersuchten wir auf Loeffler-Serum, sowie in Bouillonkulturen, in die wir Klümpchen von Hammelfibrin einlegten. Die Loeffler-Röhrchen zeigten nach 1—2tägiger Bebrütung Erweichung und nach ca. 10—14 Tagen Verflüssigung. Die Auflösung der Fibrinstückchen begann bei den meisten Stämmen nach 2—3tägigem Brutschrankaufenthalt bei 37° C. Nach 10—14 Tagen war eine vollständige oder teilweise Fibrinauflösung zu beobachten. Bei einigen Stämmen war das Fibrin bereits nach 4—5 Tagen völlig verdaut.

Von den kollolytischen Eigenschaften der Staphylokokken überzeugten wir uns durch die Gelatinestichkultur. Alle aus akuten Eiterungen gezüchteten

Staphylokokkenstämme zeigten nach 1 Tag beginnende Verflüssigung, die im Verlaufe von weiteren 3—4 Tagen zur vollständigen Verflüssigung führte. Einige Stämme, die aus chronischen Eiterungsprozessen gezüchtet waren, hatten die Gelatine nach 8 Tagen noch nicht verflüssigt. Von den saprophytischen Staphylokokken bewirkte die Mehrzahl auch nach 14 Tagen keine Verflüssigung, wenige nach 8—10 Tagen.

Hinsichtlich der milchkoagulierenden Fähigkeit zeigten die von uns untersuchten Staphylokokken ein sehr wechselndes Verhalten. Aus akuten Eiterungsprozessen gezüchtete Staphylokokken brachten meistens innerhalb von 1—8 Tagen die Milch zur Gerinnung, die Saprokokken zum Teil gar nicht, einige nach 3—12 Tagen.

Ueber die plasmagerinnenden Eigenschaften der lebenden Staphylokokkenstämme stellten wir bereits früher ausgedehnte Untersuchungen an, die zu folgendem Ergebnis führten: Die von den pyogenen Aureus-Staphylokokken hervorgerufene Plasmakoagulation hängt bezüglich Zeit und Intensität sehr von dem hierzu verwendeten Blutplasma (Menschen, Kaninchen, Hammel, Schwein, Rind) ab. In Kaninchenblutplasma setzt der Gerinnungsprozeß am frühesten ein. Weiterhin ist der Ausfall der Gerinnungsreaktion bei Verwendung verschiedener Plasmaarten sehr von dem Zitratgehalt des Plasmas abhängig. In Rinder-, Esel-, Schweine- und Pferdeblutplasma setzt die Gerinnungsreaktion in Plasma mit höherem Zitratgehalt frühzeitiger ein und verläuft zum Teil intensiver, während diese Beobachtung bei Menschen- und Ziegenblutplasma nicht gemacht werden konnte. Die zugesetzte Keimzahl ist für den Verlauf und Ausfall der Plasmagerinnung insofern von Bedeutung, als durch Einsaat geringer Keimmengen ($\frac{1}{100}$ bis $\frac{1}{100000}$ Oese) der zeitliche Ablauf der Reaktion stark beeinflusst wird.

Nach Kleinschmidt soll die Fermentwirkung an die Leiber der lebenden Staphylokokken gebunden sein. Gratia konnte jedoch mit keimfrei filtrierten Staphylokokkenkulturen positive Gerinnungsreaktionen hervorrufen. Wir legten, um diese Frage zu klären, von verschiedenen Staphylokokkenstämmen Bouillonkulturen an, die nach 3—14tägiger Bebrütung bei 37° C durch Seitz-Filter filtriert wurden. Das Filtrat wurde auf Sterilität untersucht und die keimfreien Filtrate auf ihren Gehalt an Staphylokinase. Zu 2 ccm Kaninchenzitratplasma wurde 1 ccm Filtrat zugesetzt und bei 37° C gehalten. Nach 24 Std. war in den meisten Röhren Gerinnung eingetreten. Das Ferment war meist vom 4. Tag ab nachweisbar. Da nur ganz geringe Mengen lebender Staphylokokken nötig sind, um eine Plasmakoagulation innerhalb von 24 Std. hervorzurufen, so mußten die Versuchsröhren nach Eintritt der Gerinnung genauestens auf das eventuelle Vorhandensein von Staphylokokken untersucht werden. Wir brachten zu diesem Zweck das Koagulum, das sich später wieder auflöst, in einen großen Kolben mit Bouillon, der längere Zeit bebrütet wurde. Auch füllten wir die Versuchsröhren mit Bouillon auf, und hielten dieselben längere Zeit bei 37° C. Die Proben erwiesen sich alle als steril, und die Gerinnung mußte durch das im Filtrat enthaltene Ferment bedingt sein. Nach einem Vorschlage von H. Schmidt änderten wir die Versuchsanordnung derart, daß wir in eine Staphylokokkenbouillonkultur einen Zellophanbeutel mit Kaninchenblutplasma brachten und dann beobachteten, ob durch Diffusion des Fermentes das Plasma koaguliert wurde, was in der Tat der Fall war.

Es gelingt also, durch Filtration das Gerinnungsferment von den Staphylokokkenleibern zu trennen und mit dem keimfreien Filtrat das Kaninchenblutplasma zu koagulieren. Eiweißlösende Fermente konnten wir in den Filtraten nicht nachweisen.

Literatur.

NeiBer, Kolle-Kraus-Uhlenhuth Handbuch d. pathog. Mikroorganismen. Bd. 4. — Much, Biochem. Ztschr. Bd. 4. 1908. — Dold, Centralbl. f. Bakt. Parasitenkd. u. Infektionskr. Abt. I. Orig. Bd. 102. 1927. — Groß, Klin. Wochenschr. 1927. Nr. 48 u. Centralbl. f. Bakt., Parasitenkd. u. Infektionskr. Bd. 107. 1928. Heft 4/5.

Nachdruck verboten.

Zur Frage der experimentellen Kaninchengonorrhöe.

[Aus dem Hygienischen Institut (Vorstand: Prof. Dr. A. Lode) und der Dermatologischen Klinik (supplier. Vorstand: Dozent K. Schreiner) der Universität in Innsbruck.]

Von Dr. **J. Burtscher**,

Assistent am Hygienischen Institut,

und Dr. **R. Lauter**,

Volontärarzt der Dermatologischen Klinik.

Seit der Entdeckung des Gonokokkus war man bemüht, auf tierischen Schleimhäuten typische gonorrhöische Krankheitserscheinungen zu erzeugen. Alle diese Bemühungen waren jedoch erfolglos. In neuester Zeit schien es jedoch, wie aus den Arbeiten russischer Autoren (Korobkov, Borju u. Serisorin, Kalinin u. Fahlberg) hervorgeht, gelungen zu sein, beim Kaninchen eine sichere Ophthymo- bzw. Urogenitalgonorrhoe hervorzurufen. Das Prinzip obiger Verfasser ist, die erwählte Schleimhaut des Kaninchens mit steriler Ochsen-galle vorzubehandeln, zu sensibilisieren. Nach Beseitigung der überschüssigen Galle mit physiologischer Kochsalzlösung werden auf die betreffenden Schleimhäute Reinkulturen von Gonokokken gebracht. Die Autoren erzielten nun nach der üblichen Inkubationszeit eine sowohl klinisch typische wie auch bakteriologisch und pathologisch-anatomisch sichere Ophthymo- bzw. Urogenitalgonorrhoe, ja sie konnten sogar Antikörper und Allergieerscheinungen nachweisen. Ferner gelang es ihnen, durch Tierpassage die Gonokokken in ihrer Virulenz so zu steigern, daß auch ohne Gallenvorbehandlung eine spezifische Infektion beim Kaninchen ermöglicht wird. Von deutscher Seite (Partsch u. Nagell, Schrader) wurden diese Angaben nachgeprüft. Das Ergebnis war ein vollkommen negatives, obwohl die Versuchsbedingungen genau eingehalten wurden und eine große Anzahl von Kaninchen zu den Versuchen Verwendung fand.

Unsere Versuche erstreckten sich ebenfalls auf eine größere Anzahl von Kaninchen, wobei sowohl junge Tiere von einigen Wochen wie auch ältere bis zu 1 Jahre zur Verwendung kamen, da bekannt ist, daß alle Schleimhäute jugendlicher Individuen empfänglicher für Infektionen sind, als die alter Tiere. Als Ort der sich abzuspielenden Erkrankung wählten wir den Konjunktivalsack. Im Vorversuche wurde die Wirkung verschiedenprozentiger Galle allein, ohne nachfolgende Inokulation von Gonokokken, auf die Augen von verschiedenen Kaninchen geprüft. Der Konjunktivalsack je eines Kaninchens wurde mit 25, 50, 75 und 100proz. steriler Ochsen-galle vorbehandelt und 2 Std. nachher mit steriler physiologischer Kochsalzlösung gründlich ausgespült. Die Ergebnisse waren geringgradige bis schwerste Entzündungserscheinungen der Conjunctiva und Cornea, gerade proportional der verwendeten Galle-

konzentration. So sahen wir beim Kaninchen, das mit 100proz. Galle behandelt war, schon nach 3 Std. Verklebtsein der Augenlider, schwerste Injektion der Conjunctiva palp. et bulbi, sowie hochgradige Chemosis und hauchige Trübung der Cornea. Die Entzündungserscheinungen nahmen die ersten 3 Tage zu, um am 7. Tage post Sensibilisierung zur Restitutio ad integrum zu führen.

Bei den folgenden Versuchen hielten wir uns bezüglich der Technik an die Angaben der russischen Autoren. Bei Vorbehandlung des Kaninchenauges mit 25proz. Galle und nachheriger Inokulation von Gonokokkenreinkulturen war das Auge nach 24—48 Std. wieder vollkommen normal, obwohl verschiedene Gonokokkenstämme zur Verwendung kamen. Das gleiche Ergebnis erzielten wir bei Einreibung von Sekret eines unbehandelten Gonorrhoeikers im akuten Stadium, in den mit 25proz. Galle vorbehandelten Konjunktivalsack. Die Kaninchen wurden selbstverständlich durch längere Zeit hindurch beobachtet, aber die Augen blieben nach Ablauf der anfänglichen Reizung normal und ohne Gonokokkenbefund. Etwas länger anhaltende Entzündungserscheinungen wurden bei Kaninchen beobachtet, deren Auge mit 50proz. Galle vorbehandelt war. Jedoch weder beim Einführen von Gonokokkenreinkulturen noch von frischem Sekret von Patienten wurde ein positives Ergebnis erzielt. Bei Verwendung von 75proz. Galle zur Vorbehandlung unter sonst gleichen Versuchsbedingungen waren die Entzündungserscheinungen entsprechend der höheren Gallekonzentration noch heftiger, aber wieder der Erfolg ein negativer.

Trotz langer Beobachtung der Tiere konnte eine Ophthalmoblennorrhoe nie festgestellt werden. Die schwerste und am längsten andauernde Erkrankung des Kaninchenauges erzielten wir bei Vorbehandlung der Conjunctiva mit 100proz. Galle und nachheriger Beimpfung mit Gonokokkensekret oder Reinkultur. Es konnte festgestellt werden, daß besonders bei Einverleibung von Gonokokkensekret die Entzündungserscheinungen am längsten anhielten. Es sei uns gestattet, auf einen derartigen Fall etwas näher einzugehen.

24 Std. nach Behandlung der Conjunctiva waren die Lidränder des Auges total verklebt. Beim Öffnen der Lider fällt die stark entzündete Conj. palp., die samtartig blaurot verfärbt ist, auf. Nickhaut ödematös, Cornea gestippt, ziliar. Randnetz deutlich ausgebildet. Sekret fadenziehend. In den folgenden Tagen steigern sich die Entzündungserscheinungen. Am 7. Tage nach der Beimpfung starke Hyperämie der Schleimhäute, Ulcus corneae. Bis zum 15. Tage keine Besserung. Am 16. Tage wurden im Sekretabstriche gramnegative, gonokokkenähnliche Gebilde gesehen. Die Kultur ergab gramnegative Diplokokken, die sich jedoch bei näherer Untersuchung als bipolare Stäbchen erwiesen. Wir führen diesen Befund deshalb an, da bei minder eingehender bakteriologischer Differenzierung solche „Kokken“, die auf Aszitesagar ähnliche Kolonien bilden wie der Gonokokkus, leicht zu Täuschungen Anlaß geben können. Vom 17. Tage an gingen die Entzündungserscheinungen am Auge zurück und nach 22 Tagen war das Kaninchenauge fast vollkommen normal. Gonokokken konnten nie nachgewiesen werden. Bei weiteren, auf dieselbe Art behandelten Tieren war die Dauer der Entzündungserscheinungen ähnlich lange.

Auffallend war, daß bei Kaninchen, die mit 100proz. Galle und Gonokokkenreinkulturen beimpft wurden, die Krankheitserscheinungen in viel kürzerer Zeit zurückgingen. Die Veränderungen des Auges hielten ungefähr so lange an, wie sie bei der Behandlung der Conjunctiva mit Galle allein beobachtet wurden. Die Einimpfung von abgetöteten Gonokokken in den Konjunktivalsack der gallevorbehandelten Tiere zeigte das gleiche Ergebnis. Die Veränderungen des Auges waren wieder so, wie bei mit Galle allein behandelten Tieren. Beim Einreiben von sterilem Eiter in die Schleimhäute der vorbehandelten Kaninchen war auch nur lediglich Gallewirkung zu erkennen.

Auf Grund dieser Versuchsergebnisse müssen wir zum Schlusse kommen, daß die schwere, bis zur Geschwürsbildung auf der Hornhaut führende Entzündung der Schleimhäute des Auges eine Gallewirkung darstellt, und daß

die Entzündungserscheinungen bedeutend heftiger sind bei Zusatz von frischem Gonokokkensekret, als bei Zusatz von Gonokokkenreinkultur. Bei keinem der Tiere konnten trotz der heftigen, oft bis zu 3 Wochen andauernden Krankheitserscheinungen Gonokokken nachgewiesen werden. Die Versuchsergebnisse von Borju u. Serisorin, Korobkov, Kalinin u. Fahlberg konnten demnach nicht bestätigt werden.

Literatur.

Korobkov, zit. nach d. Ref. in Centralbl. f. Haut- u. Geschlechtskrankh. Bd. 19. 1926. S. 299. — Borju u. Serisorin, zit. nach Ref. in Zentralbl. f. ges. Hyg. Bd. 12. 1926. S. 650. — Partsch u. Nagell, Dtsch. med. Wochenschr. 1927. S. 835. — Schrader, ebenda. 1927. S. 1467. — Kalinin u. Fahlberg, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 102. 1927. S. 359.

Nachdruck verboten.

Versuche zum Nachweis der *Spirochaeta pallida* in den Lymphdrüsen von Paralytikern.

[Aus dem Hygienisch-Bakteriologischen Institut der Universität Bern (Direktor: Prof. Dr. G. Sobernheim).]

Von Dr. **Hans v. Fischer.**

Durch eine größere Reihe von Arbeiten aus neuerer Zeit ist immer mehr die wichtige Tatsache bestätigt worden, daß zwischen der Syphilis des Menschen und der experimentellen Kaninchensyphilis in bezug auf klinischen Verlauf, Symptomatologie, Pathologie und Immunität weitgehende Analogien bestehen. Namentlich sind hier die Arbeiten von Uhlenhuth, Kollé, Manteuffel und ihren Mitarbeitern, sowie die der amerikanischen Autorenpaare Pearce u. Brown, Chesney u. Kemp, Nichols u. Walker zu nennen, die unsere Kenntnisse von der experimentellen Syphilis des Kaninchens wesentlich gefördert haben. Von besonderem Interesse ist die dabei ermittelte Tatsache, daß die Kaninchensyphilis mit Regelmäßigkeit zur Generalisierung führt und, soweit nicht therapeutische Maßnahmen ergriffen werden, anscheinend dauernd generalisiert bleibt.

Schon früher war es aus den Untersuchungen von Uhlenhuth u. Mulzer, Tomaszewski u. a. bekannt, daß man bei syphilitisch infizierten Tieren das Virus auch in inneren Organen zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion nachzuweisen vermag, und auch die Infektion der Lymphdrüsen, namentlich der regionären Lymphdrüsen, war bereits wiederholt festgestellt worden. Durch Pearce u. Brown wurde dann aber zuerst darauf aufmerksam gemacht, daß bei der gewöhnlichen Art der experimentellen Erzeugung der Syphilis bei Kaninchen, nämlich durch intratestikuläre oder subkrotale Verimpfung spirochätenhaltigen Materials, die Poplitealdrüsen regelmäßig infiziert sind, und daß die Anwesenheit von Spirochäten sich hier während des ganzen Verlaufes der syphilitischen Infektion konstatieren läßt, auch dann, wenn alle klinischen Erscheinungen längst verschwunden sind. Zum Nachweis der Drüseninfektion genügt die mikroskopische Untersuchung indessen nicht, vielmehr haben Pearce u. Brown und alle anderen Forscher sichere Resultate nur durch Verimpfung des Untersuchungsmaterials auf das Kaninchen erhalten. Die Kaninchensyphilis geht, wie sich hieraus ergibt, nach Abheilung der manifesten Symptome in ein latentes Stadium über, das jahrelang anzudauern

pfllegt, und wir haben zugleich in der Untersuchung der Poptealdrüsen die Möglichkeit, uns jederzeit von dem Bestehen einer latenten Infektion zu überzeugen. Wenn auch die Poptealdrüsen in dieser Hinsicht anscheinend die sichersten und konstantesten Resultate geben, indem sie so gut wie ausnahmslos verimpfbares Virus enthalten, so beschränkt sich die latente Infektion keineswegs nur auf diese Art von Lymphdrüsen; sie kann nach den Untersuchungen von Uhlenhuth, Manteufel, Prigge u. Rothermund u. a. oft auch an anderen Drüsen nachgewiesen werden und erstreckt sich, wie bereits erwähnt, auch auf verschiedenartige innere Organe.

Ob die Verhältnisse beim Menschen ähnlich liegen, ist bisher nur wenig geprüft worden. Von vornherein liegt die Vermutung gewiß sehr nahe, daß sich beim Menschen gleichfalls eine Infektion der Lymphdrüsen auch im Latenzstadium der Syphilis nachweisen lassen müßte, da ja bei der menschlichen Lues die Generalisierung fast noch deutlicher zutage tritt als im Kaninchenversuch. Die Verhältnisse liegen hier insofern kompliziert, als die menschliche Syphilis zumeist in Behandlung genommen wird und unter dem Einfluß der therapeutischen Maßnahmen, namentlich bei der Anwendung von Arsenpräparaten, die Bedingungen verändert werden. Auch im Kaninchenexperiment gibt die Drüsenkontrolle begreiflicherweise positive Resultate nur dann, wenn die Infektion des Kaninchens unbeeinflußt ihren normalen Verlauf nehmen kann. Sobald die Infektion chemotherapeutisch behandelt wird, können je nach dem Erfolg die Spirochäten aus den Drüsen dauernd oder vorübergehend verschwinden (vgl. Kolle u. Prigge). Es darf daher nicht all zu sehr überraschen, daß die Untersuchungen, die bisher beim Menschen vorgenommen worden sind, im großen und ganzen zu einem negativen Ergebnis geführt haben. So erhielten Engmann u. Ebersson in 14 Fällen mit der Verimpfung der Lymphdrüsen auf das Kaninchen nur 3mal ein positives Resultat; in den übrigen Fällen mißlang der Spirochätennachweis. Worms berichtet, daß er mit seinen bisherigen Drüsenuntersuchungen bei menschlicher Syphilis nur negative Resultate zu verzeichnen hatte.

Die Frage, ob es beim syphilitischen Menschen gelingt, eine latente Infektion durch das Drüsenexperiment aufzudecken, ist auch in dem hiesigen Institut experimentell geprüft worden. Ueber die Resultate, die bei Syphilitikern des Sekundär- und Tertiärstadiums erhalten wurden, wird später von anderer Seite (Zurukzoglu) berichtet werden¹⁾. Mir selbst fiel die Aufgabe zu, speziell bei Paralytikern über die Drüseninfektion Ermittlungen anzustellen.

Die latente Infektion des Paralytikers ist ja noch unter einem anderen Gesichtspunkt zu betrachten. Auch unabhängig von der Frage nach der Existenz eines besonderen neurotrophen Virus, die heute im allgemeinen mehr in negativem Sinne beantwortet wird, scheint doch manches darauf hinzudeuten, daß die *Spirochaeta pallida* sich in diesem Stadium und bei dieser Form der syphilitischen Spätinfektion nur in dem Zentralnervensystem lokalisiert findet, wenigstens ist das eine vielfach vertretene Auffassung. Es wäre also von vornherein denkbar, daß man bei der Paralyse im Gegensatz zu den Verhältnissen bei der latenten Infektion des Sekundär- und Tertiärstadiums in den Lymphdrüsen übertragbares Virus nicht mehr antrifft. Die Drüsenkontrolle bei Paralytikern mußte daher ein ganz besonderes Interesse bieten, namentlich dann, wenn es gelang, die Untersuchungen auch an unbehandelten Fällen anzustellen.

1) Vgl. eine kurze diesbezügliche Mitteilung bei Sobernheim, Syphilisspirochäte, in Handbuch Kolle-Wassermann, Bd. 7. 3. Aufl., sowie Schweiz. med. Wochenschr. 1927. Nr. 40.

Zur Durchführung der Experimente wurden mir durch den Direktor der Kant. Irrenanstalt Waldau, Herrn Prof. v. Speyr, die geeignet erscheinenden Paralysefälle in entgegenkommender Weise zur Verfügung gestellt. Ich möchte Gelegenheit nehmen, ihm auch an dieser Stelle hierfür den besten Dank auszusprechen.

Zur Gewinnung des Untersuchungsmaterials wurden den Patienten unter Lokalanästhesie je 1—3 Lymphdrüsen des Trigonum inguinale, teilweise auch Axillar- und Supraklavikularlymphdrüsen exstirpiert. Die Operation führte jedesmal Herr Dr. Pedotti, I. Assistent der Chirurgischen Universitätsklinik Bern, aus, dem ich für seine tatkräftige Unterstützung zu besonderem Dank verpflichtet bin. Die Lymphdrüsen wurden durch den Chirurgen sorgfältig von anhaftendem Fett befreit, um möglichst nur Lymphdrüsengewebe zur Verimpfung zur Verfügung zu haben. Das in sterilen Petri-Schalen in das Laboratorium verbrachte Material gelangte sofort zur Verarbeitung. Die Lymphdrüsen wurden zu diesem Zweck in kleine, ca. hanfkorngroße Stückchen zerschnitten und in dieser Form nach der zuerst von Tomaszewski angegebenen Taschenmethode subskrotal verimpft.

Ein anderer Teil des Materials wurde in sterilem Mörser mit physiologischer Kochsalzlösung zu einer dichten Emulsion verrieben, die zur intratestikulären Injektion diente. Die Emulsion wurde überdies im Dunkelfeld auf Spirochätengehalt untersucht, ohne je ein positives Resultat zu erhalten.

Von jedem Paralysefall wurden 3 große Kaninchen beiderseits subskrotal infiziert, ein weiteres Kaninchen beiderseits intratestikulär geimpft. Die Absicht war, die Tiere längere Zeit klinisch zu beobachten und dann, wenn etwa keine Erscheinungen sich zeigen sollten, den reaktionslos gebliebenen Versuchstieren die Poplitealdrüsen zu entnehmen und diese auf eine 2. Serie von Kaninchen zu verimpfen. Es ist ja aus den Untersuchungen von Kolle und seinen Mitarbeitern, sowie von Worms u. a. bekannt, daß die Drüsenverimpfung unter Umständen bei der ersten Kaninchengeneration noch nicht zum Ziele führt und keine manifesten syphilitischen Erscheinungen hervorruft, daß sich vielmehr unter diesen Tieren „Nuller“ finden können, die erst durch die Fortsetzung des Drüsenexperimentes in der zweiten, ausnahmsweise sogar erst in der dritten Generation aufgedeckt werden.

Die strenge Durchführung dieses Versuchsplanes wurde mehrfach dadurch gestört, daß einige Versuchstiere an interkurrenten Krankheiten, infolge von Stallinfektionen, vorzeitig eingingen. Um auch diese Tiere für den Versuch verwerten zu können und das Untersuchungsmaterial nicht verloren zu geben, wurde in solchen Fällen das Drüsenstückchen, soweit es unter der Skrotalhaut noch deutlich vorhanden und fühlbar war, wieder herausgenommen und auf ein neues Kaninchen verimpft. Das geschah bei Tieren, die schon kurze Zeit innerhalb der ersten 8—10 Tage eingingen, sonst wurden den Tieren die Poplitealdrüsen entnommen und diese weiter verimpft. In manchen Fällen erfolgte gleichzeitige Verimpfung des aus dem subskrotalen Gewebe exstirpierten Drüsenstückchens und der Poplitealdrüsen. Diese weitere Verimpfung des Materials vorzeitig eingegangener Tiere wurde stets so schnell wie möglich nach dem Tode, niemals später als nach 12—16 Std. vorgenommen. Versuche mit Leichenmaterial (Poplitealdrüsen, Sklerosen) von Tieren, die mit einem alten Passagestamm (Stamm Nichols) infiziert worden waren, hatten uns immer wieder bestätigt, daß die intratestikuläre und subskrotale Impfung selbst dann noch angeht, wenn das Material 1—2 Tage alt ist.

Bei den Versuchstieren, die uns nicht interkurrent eingingen und 4 Monate lang ohne Erscheinungen geblieben waren, wurde Material zur weiteren Verimpfung auf eine neue Serie von je 3—4 Kaninchen entnommen. Zu diesem

Zweck wurden die Tiere getötet und ein Gemisch von Organen und Lymphdrüsen (Milz, Leber, popliteale, mesenteriale, inguinale und retroperitoneale Lymphdrüsen) hergestellt, das gewöhnlich von den zusammengehörenden Tieren je eines Paralysefalles gemeinsam verarbeitet und intratestikulär und subskrotal verimpft wurde.

Im ganzen gelangten 8 Fälle von klinisch sicherer progressiver Paralyse zur Untersuchung. Von den 8 Fällen sind 6, soweit sich nach den Krankengeschichten der Irrenanstalten und Spitäler, in denen sie untergebracht waren, feststellen läßt, nie einer spezifischen Behandlung unterworfen worden, 2 hatten in letzter Zeit eine Malariakur durchgemacht, 1 von ihnen dazu noch eine Salvarsankur¹⁾.

Bei den 6 unbehandelten Fällen war die Wa.R. in Blut und Liquor stets positiv, bei den beiden behandelten Fällen war sie vor der Behandlung in Blut und Liquor positiv gewesen. Sie wurde nach der Behandlung bei dem einen Fall (8, nur Malariakur) in Blut und Liquor negativ, während sie bei dem anderen Fall (7, Salvarsan- und Malariakur) im Blut wechselnd negativ, schwach positiv, positiv, zuletzt negativ war und auch der Liquor ähnliche Verhältnisse zeigte.

Einer der behandelten Fälle (4) ist, nachdem ihm am 24. 3. 27 die Lymphdrüsenexstirpation gemacht worden war, am 4. 6. 27 im klassisch-paralytischen Endzustande zugrunde gegangen. Die Autopsie ergab neben der Gehirnatrophie noch eine Pachy- und Leptomeningitis chronica, Mesaortitis syphilitica und Leberverfettung.

Aus den Krankengeschichten seien noch die folgenden Einzelheiten kurz wiedergegeben:

Fall 1: A. W., Dienstmann, geb. Okt. 1875. Alter beim Beginn der Erkrankung (1916) 41 Jahre. Klinische Diagnose: Progressive Paralyse, demente Form. Zeitpunkt der Infektion? Keinerlei spezifische Behandlung. Wa.R. in Blut und Liquor stets positiv.

Fall 2: U. L., Käser, geb. 1. Sept. 1881. Alter beim Beginn der Erkrankung (1925) 43½ Jahre. Klinische Diagnose: Progressive Paralyse, rasch verblörende Megalomanie. Zeitpunkt der Infektion? Keine spezifische Behandlung. Wa.R. in Blut und Liquor stets positiv.

Fall 3: R. N., Handlanger, geb. 18. Juni 1878. Alter beim Beginn der Erkrankung (1926) 48 Jahre. Klinische Diagnose: Progressive Paralyse. Zeitpunkt der Infektion? Niemals behandelt. Wa.R. in Blut und Liquor stets positiv.

Fall 4: J. K., Knecht, geb. 17. Juli 1878, Alter beim Beginn der Erkrankung (1925) 47 Jahre. Klinische Diagnose: Progressive Paralyse. Zeitpunkt der Infektion? Keine spezifische Behandlung. Wa.R. in Blut und Liquor stets positiv. Am 4. Juni 1927 Exitus letalis. Pathologisch-anatomische Diagnose: Atrophie des Gehirns. Pachy- und Leptomeningitis chronica. Exzentrische Herzhypertrophie, rechts, pleuritische Adhäsionen. Lungenemphysem. Klappen- und Arteriosklerose, Mesaortitis syphilitica. Verfettung der Leber. Struma diffusa et nodosa. Multiple Hautgeschwüre.

Fall 5: G. P., Gütervorarbeiter S. B. B., geb. 29. Sept. 1889. Alter beim Beginn der Erkrankung (1925) 36 Jahre alt. Klinische Diagnose: Progressive Paralyse. Zeitpunkt der Infektion? Keine spezifische Behandlung. Wa.R. in Blut und Liquor positiv.

Fall 6: L. B., Elektriker, geb. 19. März 1874. Alter bei Beginn der Erkrankung (1922) 48 Jahre. Klinische Diagnose: Progressive Paralyse, dement-halluzinatorische Form mit manisch depressiven Schwankungen, übergehend in eine affektstumpfe Halluzinose. Zeitpunkt der Infektion? 1923: Beginn mit Tuberkulin-Neosalvarsankur, nach kurzer Zeit abgebrochen. Später (1924) Malariakur. Wa.R. in Blut anfänglich positiv, später schwankend (negativ und positiv), in Liquor stets positiv, in der Stärke wechselnd.

Fall 7: A. P., Handlanger, geb. 29. Mai 1873. Alter beim Beginn der Erkrankung (1920) 47 Jahre. Klinische Diagnose: Progressive Paralyse. Zeitpunkt der Infektion? Keine spezifische Behandlung. Wa.R. Blut und Liquor stets positiv.

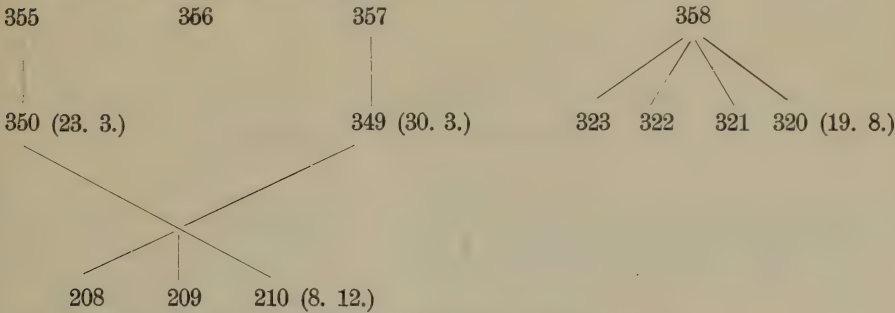
1) Für die Krankengeschichten benutzte ich die Akten der Irrenanstalt Waldau und die Angaben in der Arbeit von F. Walther und S. Abelin, Ueber Blut- und Liquorbefunde bei unbehandelten und behandelter progressiver Paralyse und über Befunde bei größerer Liquorentnahme. Arch. f. Psychiatrie u. Nervenkrankh. Bd. 78. 1926. H. 3.

Fall 8: A. H., Buchhalter, geb. 14. Juni 1882. Alter bei Beginn der Erkrankung (1922) 40 Jahre. Klinische Diagnose: Progressive Paralyse, dement-halluzinatorische Form. Zeitpunkt der Infektion 1900? 1924 Malariakur. Wa.R. (Blut) anfänglich positiv, später negativ, desgleichen im Liquor.

Der Verlauf der Tierversuche ist aus den im folgenden gegebenen Aufzeichnungen zu ersehen:

Fall 1.

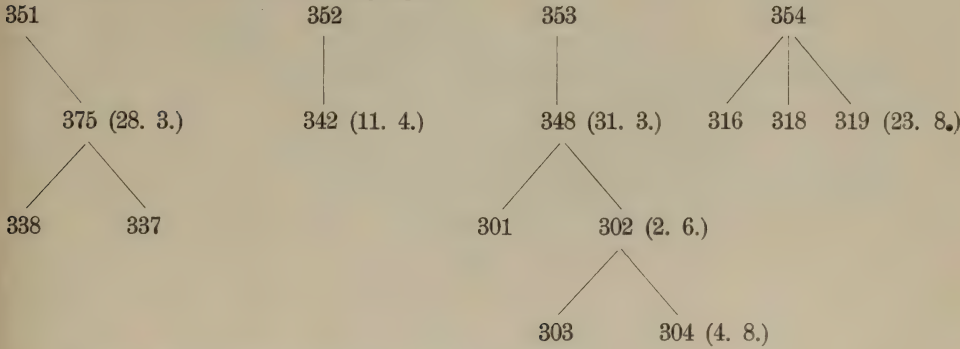
Verimpfung von Inguinaldrüsen am 14. 3. auf 4 Kaninchen.
Verlauf und weitere Uebertragungen:



Kein Tier hat klinische Zeichen von Syphilis gehabt.

Fall 2.

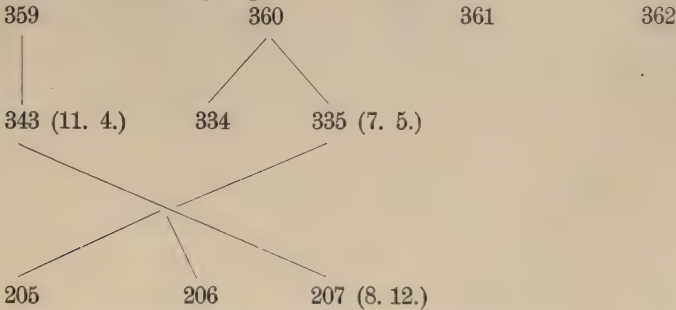
Verimpfung von Inguinaldrüsen am 14. 3. auf 4 Kaninchen.
Verlauf und weitere Uebertragungen:



Kein Tier hat klinische Zeichen von Syphilis gehabt.

Fall 3.

Verimpfung von Inguinaldrüsen am 23. 4. auf 4 Kaninchen.
Verlauf und weitere Verimpfungen:

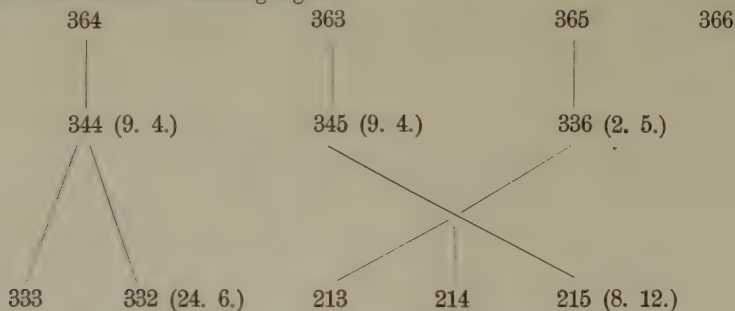


Kein Tier hat klinische Zeichen von Syphilis gehabt.

Fall 4.

Verimpfung von Inguinaldrüsen am 24. 3. auf 4 Kaninchen.

Verlauf und weitere Uebertragungen:

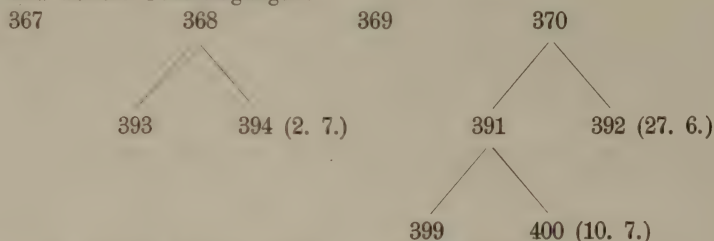


Kein Tier hat klinische Erscheinungen von Syphilis gehabt.

Fall 5.

Verimpfung von Inguinaldrüsen am 28. 3. auf 4 Kaninchen.

Verlauf und weitere Uebertragungen:

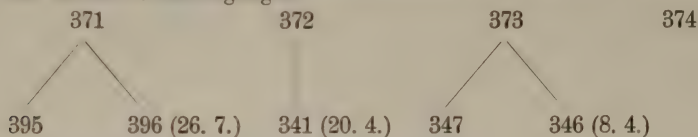


Kein Tier hat klinische Erscheinungen von Syphilis gehabt.

Fall 6.

Verimpfung von Axillar- und Supraklavikulardrüsen am 28. 3. auf 4 Kaninchen.

Verlauf und weitere Uebertragungen:

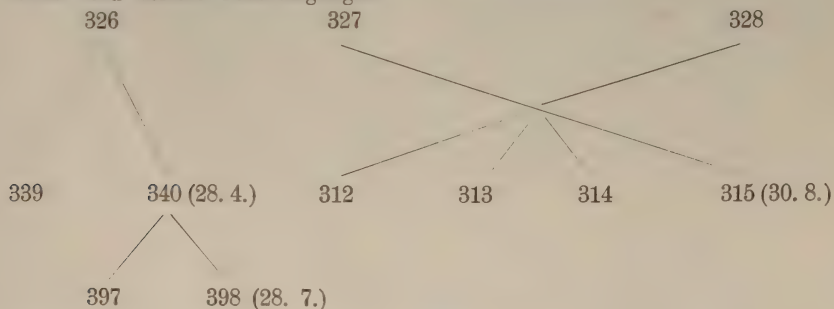


Kein Tier hat klinische Zeichen von Syphilis gehabt.

Fall 7.

Verimpfung von Inguinaldrüsen am 14. 4. auf 3 Kaninchen.

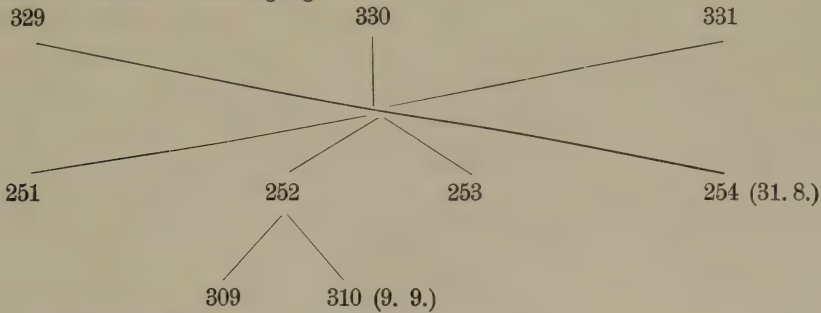
Verlauf und weitere Uebertragungen:



Kein Tier hat klinische Zeichen von Syphilis gehabt.

Fall 8.

Verimpfung von Inguinaldrüsen am 14. 4. auf 3 Kaninchen.
Verlauf und weitere Uebertragungen:



Kein Tier hat klinische Zeichen von Syphilis gehabt.

Somit sind alle Versuche resultatlos verlaufen. In keinem einzigen Falle ist es gelungen, durch Verimpfung von Drüsen von unseren 8 Paralysefällen bei Kaninchen spezifische Erscheinungen hervorzurufen, und auch die weitere Kontrolle der Versuchstiere mit Hilfe des Drüsenexperimentes hat in der zweiten und dritten Kaninchengeneration niemals irgendwelche manifesten Symptome der Syphilis entstehen lassen.

Es erscheint indessen nicht zulässig, hieraus nun mit voller Bestimmtheit den Schluß abzuleiten, daß die Drüsen des Paralytikers immer frei von syphilitischem Virus seien. Die erstmalige Uebertragung der Spirochäten vom syphilitischen Menschen auf das Kaninchen ist auch bei einwandfreiem Infektionsmodus und bei Verwendung einer größeren Zahl von Versuchstieren für jeden einzelnen Fall bekanntermaßen doch immer noch ein unsicheres Experiment. So sicher das Virus, das durch Tierpassagen dem Kaninchenorganismus angepaßt ist, bei weiteren Ueberimpfungen angeht, so unzuverlässig ist nach allen vorliegenden Erfahrungen die Infektion des Kaninchens mit Menschenmaterial. Zwar berichten Kolle u. Prigge neuerdings, daß, wenn man die Tatsache des Vorkommens von Nullern berücksichtigt und von den nicht reagierenden Tieren Drüsenmaterial weiterverimpft, man bessere Resultate erzielt. Aber das gleiche Verfahren ist ja auch von mir angewendet worden. Wenn ich trotzdem bei den untersuchten 8 Patienten niemals eine erfolgreiche Infektion erzielen konnte, so läßt sich doch wohl die Vermutung aussprechen, daß beim Menschen und speziell beim Paralytiker die Infektion der Drüsen mit virulenten Spirochäten nicht in gleichem Maße und mit gleicher Regelmäßigkeit vorhanden sein dürfte, wie bei dem Kaninchen, das wir mit hochvirulentem Passagematerial infizieren.

Sicherlich bedarf die ganze Frage noch weiterer Aufklärung; die vorliegenden Experimente liefern nur einen bescheidenen Beitrag und bestätigen in der Hauptsache die Resultate, die von Ebersson u. Engmann und Worms bei Syphilitikern erhalten worden sind.

Zusammenfassung.

In 8 Fällen von Paralyse wurde versucht, in den Lymphdrüsen virulentes verimpfbares Syphilisvirus (*Pallida*-Spirochäten) nachzuweisen. — Soweit sich feststellen ließ, hatte in 6 Fällen niemals eine Behandlung stattgefunden, 2 Fälle waren vorher chemotherapeutisch bzw. mittels künstlicher Malaria-

infektion behandelt worden. — Die Verimpfung der Inguinaldrüsen, Axillar- und Supraklavikulardrüsen erfolgte subkrotal bzw. intratestikulär auf je 4 Kaninchen. Bei keinem Tier traten syphilitische Erscheinungen auf. Von den Versuchstieren wurde Drüsen- und Organmaterial auf eine neue Kaninchen- generation und von dieser zum Teil auf eine dritte Kaninchengeneration weiterverimpft. Auch hier blieb jeder Erfolg aus. — Bei der Beurteilung des Ergebnisses ist zu berücksichtigen, daß die Uebertragung der Pallida- Spirochäten vom Menschen auf das Kaninchen in der Regel nur schwer gelingt, gleichwohl scheint eine Drüseninfektion bei der menschlichen Paralyse zumindest nicht häufig zu bestehen.

Literatur.

Brown u. Pearce, Journ. of exp. Med. Vol. 31. 1920. — Chesney a. Kemp, *ibid.* Vol. 44. 1926. — Ebersson a. Engmann, Journ. of Americ. Med. Assoc. Vol. 76. 1921. — A. of Derm. a. Syph. Vol. 3. 1921. — Kolle, Dtsch. med. Wochenschr. 1922. 1924. 1926. — Kolle u. Evers, *ebenda.* 1926. — Kolle u. Prigge, *ebenda.* 1927. — Mantoufel u. Worms, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 102. 1927. — Nichols a. Walker, Journ. of exp. Med. Vol. 37. 1923. — Pearce a. Brown, *ibid.* Vol. 35. 1922. — Prigge, Med. Klin. 1926. — Prigge u. Rothermundt, Derm. Zschr. Bd. 50. 1927. — Sobernheim, Handbuch der pathogenen Mikroorganismen, Kolle u. Wassermann. Bd. 7. 1927. S. 31 ff. — Tomaszewski, Dermat. Ztschr. Bd. 18. 1911. — Uhlenhuth u. Großmann, A. f. Derm. u. Syph. Bd. 152. 1926; Klin. Wochenschr. 1927. — Uhlenhuth u. Mulzer, Dtsch. med. Wochenschr. 1911; Arb. Kais. Ges.-Amt. Bd. 44. 1913. — Worms, Dtsch. med. Wochenschr. 1926 u. 1927; Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 97. Beiheft. S. 239.

Nachdruck verboten.

Bestehen zwischen Variolavakzine und Lyssa Immunitätsbeziehungen?

II. Mitteilung.

[Aus der Bakteriologischen und der Veterinärabteilung des Reichsgesundheitsamtes in Berlin-Dahlem.]

Von Prof. Dr. E. Gildemeister und Dr. P. Karmann.

Die Versuche, über die wir in unserer 1. Mitteilung berichteten, hatten ergeben, daß Wutimmunität den Verlauf einer kutanen Pockenimpfung bei Kaninchen und Meerschweinchen nicht beeinflußt. In der Frage jedoch, ob umgekehrt Pockenimmunität eine gesteigerte Resistenz gegenüber einer Wutinfektion verleiht, wie sie Busson annimmt, hatten unsere Versuche zu einer völlig befriedigenden Klärung noch nicht geführt. Sie hatten ergeben, daß pockenimmune Meerschweinchen und Kaninchen nach intramuskulärer Infektion mit Wutvirus in geringerer Zahl, nach intrazerebraler Infektion in größerer Zahl an Wut als in gleicher Weise infizierte Kontrolltiere erkrankten und starben. Wir hielten uns nicht für berechtigt, in dem einen Fall eine Resistenzsteigerung und in dem anderen Falle eine Resistenzverminderung anzunehmen, sondern sprachen uns dahin aus, daß die von uns beobachteten Unterschiede in der Resistenz noch im Bereich der möglichen Zufälligkeiten bei Tierexperimenten mit Wut liegen. Weitere Versuche mit anderer Versuchs-

anordnung zur endgültigen Klärung dieser Frage bezeichneten wir als geboten. Sie sind inzwischen von uns ausgeführt worden; über ihr Ergebnis sei nachstehend kurz berichtet.

Wir wählten für unsere weiteren Versuche als Angriffsorgan die Hornhaut des Kaninchenauges; diese läßt sich bekanntlich auch mit kleineren Mengen von Vakzinevirus leicht infizieren und zeigt alsdann charakteristische und mühelos nachweisbare Veränderungen. Nach überstandener Vakzineinfektion hellt sich die Hornhaut, falls die Infektion nicht zu intensiv gewesen ist, innerhalb weniger Wochen wieder auf und besitzt nunmehr eine mehr oder weniger hochgradige Immunität gegenüber Vakzinevirus. Während nun die Vakzineinfektion der Hornhaut sich im wesentlichen — aber nicht immer — auf der geimpften Hornhaut abspielt, ist der Verlauf einer kornealen Infektion mit Wutvirus — Virus fixe und Straßenvirus — ein anderer. Im Gegensatz zur Vakzineinfektion kommt es an der mit Wutvirus infizierten Hornhaut zu keinerlei krankhaften Veränderungen. Die Hornhaut zeigt weder makroskopisch noch mikroskopisch irgendwelche Veränderungen. Das Wutvirus passiert nur die Hornhaut und gelangt in das Zentralnervensystem, von wo aus es dann die spezifische Erkrankung auslöst. Nicht jedes Wutvirus läßt sich korneal erfolgreich verimpfen. Es gibt aber auch Vira, die nach kornealer Infektion mit Regelmäßigkeit eine tödliche Erkrankung an Wut hervorrufen. Ueber die Immunitätsverhältnisse der Hornhaut des Kaninchenauges nach Wutinfektion wissen wir nichts. Wir haben in der Literatur, soweit wir sie übersehen können, keine Angaben darüber gefunden, ob es gelingt, die Hornhaut gegen Wutvirus zu immunisieren. Die Fragestellungen, die sich für uns nunmehr ergaben, sind leicht ersichtlich.

I. Wie verhalten sich Kaninchen mit vakzineimmuner Hornhaut gegenüber einer kornealen Wutinfektion?

30 Kaninchen im Gewichte von etwa 2—2,5 kg wurden zu verschiedenen Zeiten (vom 24. 11. 27 bis 6. 1. 28) je einmal mit Neurolapine (Stamm Gildemeister-Herzberg) in der Verdünnung 1:2000 korneal infiziert. Die In-

Tabelle I.
Vorbehandlung der Kaninchenhornhaut mit Vakzinevirus, Nachbehandlung mit Wutvirus.

Kan. Nr.	Vorbehandlung	Nachbehandlung (15. 2. 28)	Krankheits- erscheinungen	Ver- endet am	Negrische Körper- chen	Dia- gnose	
14	28. 12. 27	Korneal mit Ge- misch von Gehirn- emulsionen der Kaninchen 582, 597, 598 u. 599. Kan. 599 war intrazerebral, die übrigen Kanin- chen waren korne- neal mit Straßen- wutmaterial vom Hund behandelt worden und nach ungefähr 14 Tagen unter schweren Lähmungserschei- nungen an stiller Wut eingegangen.	Lähmung ab 1. 3.	3. 3.	+	Wut	
98	6. 1. 28		„ „ 29. 2.	3. 3.	+	„	
709	24. 11. 27		„ „ 26. 2.	1. 3.	+	„	
819	3. 12. 27		—	—	—	—	
836	6. 12. 27		597, 598 u. 599.	Lähmung ab 29. 2.	2. 3.	+	Wut
851	7. 12. 27		Kan. 599 war	„ „ 1. 3.	5. 3.	+	„
904	13. 12. 27		intrazerebral, die	„ „ 2. 3.	6. 3.	—	„
916	13. 12. 27		übrigen Kanin-	—	19. 2.	—	—
931	19. 12. 27		chen waren korne-	Lähmung ab 29. 2.	4. 3.	+	Wut
626	Nicht vorbehan- delte Kontroll- kaninchen		neal mit Straßen-	„ „ 1. 3.	3. 3.	+	„
627		wutmaterial vom	„ „ 27. 2.	1. 3.	+	„	
628		Hund behandelt	„ „ 1. 3.	4. 3.	+	„	
629		worden und nach	„ „ 27. 2.	28. 2.	+	„	
630		ungefähr 14 Tagen	„ „ 27. 2.	28. 2.	+	„	
631		unter schweren	„ „ 29. 2.	3. 3.	+	„	
632		Lähmungserschei-	„ „ 23. 2.	24. 2.	+	„	
633		nungen an stiller	„ „ 27. 2.	29. 2.	+	„	
634		Wut eingegangen.	„ „ 1. 3.	4. 3.	+	„	

fektion, die absichtlich schwach gewählt war, um einen nicht zu stürmischen Hornhautprozeß hervorzurufen, war, wie die Fluoreszinprobe zeigte, in allen Fällen auf beiden Hornhäuten erfolgreich. Am 15. 2. 28 wurden 9 Tiere ausgesucht, deren Hornhäute inzwischen wieder völlig abgeheilt und klar und durchsichtig geworden waren, und am gleichen Tage mit Straßenvirus vom Hund (von der Wutschutzabteilung des Hygienischen Universitätsinstituts in Breslau [Direktor: Prof. Dr. C. Prausnitz] überlassen), das eine einmalige Kaninchenpassage hinter sich hatte, infiziert. Das Ergebnis dieses Versuches ist aus Tabelle I (S. 255) ersichtlich.

Von 9 pockenimmunen Kaninchen sind 7 an Wut und eines interkurrent an Lungenentzündung gestorben, eines ist gesund und frei von Wuterscheinungen geblieben. 9 Kontrollkaninchen, die in gleicher Weise korneal mit Wutvirus am 15. 2. 28 infiziert worden waren, sind sämtlich an Wut gestorben. Zwischen vorbehandelten und Kontrolltieren ist also ein nennenswerter Unterschied im Endergebnis nicht zu konstatieren. Zwar sind die mit Vakzinevirus vorbehandelten Kaninchen im Durchschnitt etwas später gestorben als die Kontrolltiere, doch scheint uns dieser Unterschied zu geringfügig, um daraus irgendwelche Folgerungen ziehen zu können.

II. Läßt sich die Kaninchenhornhaut durch lokale Behandlung mit Wutimpfstoff immunisieren?

10 gesunde Kaninchen, deren jedes ein Gewicht von etwa 2,5 kg aufwies, wurden an 20 aufeinanderfolgenden Tagen (11. 2.—1. 3. 28) korneal an beiden Augen mit „Lyssin“-Emulsion behandelt. Das „Lyssin“ und die „Lyssin“-Emulsion waren nach den Angaben von Mießner und Baars hergestellt worden. Um das Eindringen des im „Lyssin“ enthaltenen Virus in die Hornhaut zu erleichtern, wurden an den ersten 4 Tagen (11. 2.—14. 2. 28) die durch 2proz. Kokainlösung unempfindlich gemachten Hornhäute mit sterilen, feinen Injektionskanülen netzförmig skarifiziert. Sodann wurden auf jede Hornhaut etwa 5 Tropfen täglich neu bereiteter „Lyssin“-Emulsion gegeben und mit einem Glasstab in die Hornhaut eingerieben. Vom 5.—20. Behandlungstage (15. 2. bis 1. 3. 28) unterblieb die Skarifizierung. An diesen Tagen wurde die „Lyssin“-Emulsion in die vorher nur kokainisierten Hornhäute eingerieben. Die ganze Behandlung wurde von sämtlichen Kaninchen gut vertragen. Lediglich in den ersten Tagen waren geringgradige Hornhautreizungen festzustellen, die aber auf die wiederholten Skarifikationen zurückzuführen sein dürften.

5 Tage nach der Beendigung der Lyssin-Behandlung, also am 6. 3. 28, wurden die 10 vorbehandelten Kaninchen sowie 10 weitere etwa gleich große und gleich alte, nicht vorbehandelte Kaninchen (Kontrolltiere) korneal mit Straßenvirus vom Hund (von der Wutschutzabteilung des Hygienischen Universitätsinstituts in Breslau zur Verfügung gestellt), das einmal durch Kaninchen passiert war, infiziert. Die Ergebnisse des Versuchs sind in Tabelle II (S. 257) zusammengestellt.

Von den 10 mit „Lyssin“ vorbehandelten Kaninchen starben 9 an Wut. Das 10. Kaninchen zeigte zwar vorübergehend Erscheinungen der stillen Wut (Lähmung), erholte sich aber nach einiger Zeit wieder vollständig. Von den 10 Kontrolltieren verendeten ebenfalls 9 an Wut, während 1 Kaninchen (Nr. 645) interkurrent starb. Somit sind ebenso viele vorbehandelte wie unvorbehandelte Kaninchen im Anschluß an die korneale Infektion mit Straßenvirusmaterial an Wut gestorben. Dies läßt den Schluß zu, daß uns eine Immunisierung der Kaninchenhornhaut durch lokale Behandlung mit dem Wutimpfstoff „Lyssin“ nicht gelungen ist.

Tabelle II.
Vorbehandlung der Kaninchenhornhaut mit „Lyssin“, Nachbehandlung mit Wutvirus.

Kan. Nr.	Vorbehandlung (11. 2. bis 1. 3. 28)	Nachbehandlung (6. 3. 28)	Krankheitserscheinungen	Verendet am	Negrische Körperchen	Diagnose
614	„Lyssin“ korneal	Korneal mit Gemisch von Gehirnemulsionen der Kaninchen 598, 599, 628, 634, 709 und 851. Kan. 599 war intrazerebral, die übrigen Kaninchen waren korneal mit Straßenvutmateri- al vom Hund behandelt worden und nach ungefähr 14 Tagen unter schwer. Lähmungs- erscheinungen an stiller Wut einge- gangen.	Lähmung ab 19.3.	20. 3.	—	Wut
615			„ „ 20. 3.	21. 3.	+	„
616			„ „ 21. 3.	24. 3.	+	„
617			„ „ 21. 3.	25. 3.	+	„
618			„ „ 20. 3.	22. 3.	+	„
619			„ „ 22. 3.	25. 3.	+	„
621			„ „ 22. 3.	hat sich wieder erholt		„
622			„ „ 19. 3.	24. 3.	+	Wut
623			„ „ 22. 3.	23. 3.	+	„
624			—	29. 3.	+	„
638	Nicht vor- behandelte Kontroll- kaninchen	waren korneal mit Straßenvutmateri- al vom Hund behandelt worden und nach ungefähr 14 Tagen unter schwer. Lähmungs- erscheinungen an stiller Wut einge- gangen.	Lähmung ab 21. 3.	23. 3.	+	„
639			„ „ 20. 3.	21. 3.	+	„
640			„ „ 20. 3.	21. 3.	+	„
641			„ „ 19. 3.	20. 3.	+	„
642			„ „ 20. 3.	21. 3.	+	„
643			„ „ 23. 3.	25. 3.	+	„
644			„ „ 21. 3.	24. 3.	+	„
645			—	16. 3.	—	—
646			Lähmung ab 24.3.	25. 3.	+	Wut
647			„ „ 24.3.	26. 3.	+	„

III. Wie verhalten sich Kaninchen, deren Hornhaut mit „Lyssin“ vorbehandelt ist, gegenüber einer kornealen Infektion mit kleinsten Mengen Vakzinevirus?

10 gesunde, 2—2,5 kg schwere Kaninchen wurden an 20 aufeinanderfolgenden Tagen (21. 11.—10. 12. 27) korneal an beiden Augen mit „Lyssin“

Tabelle III.
Vorbehandlung der Kaninchenhornhaut mit „Lyssin“, Nachbehandlung mit Vakzinevirus.

Kan. Nr.	Vorbehandlung (21. 11.—10. 12. 1927)	Nachbehandlung (28. 12. 27)	Ergebnis		Zahl der Herde
			rechts	links	
504	„Lyssin“ kor- neal	Korneal mit je 0,1 cem einer Verdünnung 1:3000 von Neuro- lapine (Stamm Gilde- meister-Herzberg)	1		0
506			0		2
507			4		1
510			2		2
511			0		2
513			1		0
515			0		0
521			5		1
522			3		2
523			2		1
982	Nicht vorbe- handelte Kon- trollkaninchen		5		5
983			4		0
984			1		1
985			0		1
986			0		2
987			0		0
988			0		1
989			0		0
990			2		3
991			0		1

vorbehandelt. Es wurde dabei in derselben Weise verfahren wie beim Versuch 2. Die Hornhaut der Kaninchen zeigte am Schluß der Behandlung ein völlig normales Aussehen.

Am 28. 12. 27 wurden diese Tiere und gleichzeitig mit ihnen 10 unvorbehandelte Kaninchen von annähernd gleichem Gewicht korneal mit Neuro-lapine (Stamm Gildemeister-Herzberg) infiziert, und zwar mit einer Verdünnung, von der zuvor festgestellt war, daß sie nur einige wenige Pockenherde zu verursachen imstande war. Eine so starke Virusverdünnung wurde gewählt, um eine etwa vorhandene geringfügige Resistenz der Hornhaut leichter erfassen zu können. Das Ergebnis dieses Versuches zeigt die Tabelle III. Mit Lyssin korneal vorbehandelte Kaninchen verhalten sich einer kornealen Vakzineinfektion gegenüber nicht anders als unvorbehandelte Kaninchen. Die geringfügigen Differenzen zwischen vorbehandelten und Kontrollkaninchen sind so unbedeutend, daß sie ohne weiteres vernachlässigt werden können.

Zusammenfassung.

1) Korneal mit Vakzinevirus vorbehandelte Kaninchen verhalten sich einer kornealen Nachinfektion mit Wutvirus gegenüber wie unvorbehandelte Kaninchen. — 2) Nach kornealer Vorbehandlung mit Lyssin zeigt die Kaninchenhornhaut keine Immunität gegenüber einer nachfolgenden kornealen Infektion mit Wutvirus. — 3) Die korneale Vorbehandlung mit Lyssin verleiht der Kaninchenhornhaut auch keine Resistenzsteigerung gegenüber einer kornealen Vakzineinfektion. — 4) Aus unseren Gesamtuntersuchungen ergibt sich somit keinerlei Anhalt dafür, daß Pockenimmunität eine gesteigerte Resistenz gegenüber einer Wutinfektion verleiht und umgekehrt.

Nachdruck verboten.

Ueber mykotischen purpurroten Zahnbelag (*Streptotrichosis dentium rubra*).

[Aus der medizinischen und der dermatologischen Universitätsklinik in Kiel (Direktor: Prof. Schlittenhelm, Prof. Klingmüller).]

Von **M. Bürger** und **O. Grütz** in Kiel.

Mit 1 Tafel.

Die Mikrobiologie der Mundhöhle ist reich an ungelösten Fragen, und selbst die morphologische Erkenntnis der seit Beginn der bakteriologischen Ära eifrig studierten Flora der Mundhöhle ist noch recht lückenhaft, wie jeder weiß, der sich etwas eingehender mit diesem Gegenstand beschäftigt hat. Jede Bereicherung dieses Gebietes ist wissenschaftlich von Wert, und deshalb erscheint uns auch die Mitteilung der nachfolgenden Beobachtung, trotz ihrer wahrscheinlich geringen Bedeutung für die Pathologie der Mundhöhle, gerechtfertigt. Der von uns zu beschreibende purpurrote Zahnbelag hat außerdem ein gewisses klinisch-differentialdiagnostisches Interesse, weil unseren Erfahrungen gemäß nicht selten Verwechslungen mit Zahnfleischblutungen vorkommen, welche das diagnostische Kalkül in eine falsche Richtung bringen.

Klinisches. Bei systematischen Untersuchungen der Mundhöhle von Patienten der medizinischen Klinik fiel M. Bürger das gelegentliche Vorkommen eines eigenartigen roten Belages der vorderen Zähne auf, der sich ihm bereits bei einfacher mikroskopischer Untersuchung nicht als gewöhnlicher Zahnstein, sondern als eine Erscheinung offenbar mikrobieller Natur erwies. Von Bürger auf dieses Phänomen aufmerksam gemacht, fand Grütz es kurz darauf bei Patienten der Hautklinik, zum Teil in noch ausgeprägterer Form, wieder und unterzog es einer genaueren mikroskopischen und kulturellen Untersuchung. Es handelt sich klinisch um einen sehr auffallenden intensiv roten Zahnbelag, der, wie es die bisher von uns beobachteten 5 Fälle beweisen, offenbar gar nicht exzeptionell selten vorkommt, so daß es um so seltsamer ist, wie die Erscheinung selbst der Aufmerksamkeit der Zahnärzte bisher entgehen konnte. Die purpurrote bis orangerote Verfärbung der Zähne hatte in unseren Fällen ihren Sitz in etwa 1—3 mm Entfernung vom Zahnfleischsaum, dem sie in besonders ausgeprägten Fällen in ziemlich scharfer zusammenhängender Linie ungefähr parallel läuft, dort einen geschlossenen feinkörnigen Ueberzug bildend, der nach unten hin sich in einzelne kleine rote Fleckchen und Stippchen auflöst. Auch die feinsten Stippchen sind infolge ihrer intensiven roten Farbe noch sehr deutlich als feine „Spritzerchen“ auf der Oberfläche der Zähne erkennbar.

In weniger entwickelten Fällen ist kein zusammenhängender Belag vorhanden, sondern nur isolierte rote Fleckchen im oberen proximalen Drittel der Zahnvorderflächen. Der Belag beschränkt sich meist auf das obere Drittel der Zähne, nur gelegentlich reichen die Fleckchen bis etwa zur Mitte der Zahnvorderflächen hinab. Der Belag haftet fest auf der Basis auf und läßt sich nicht, wie der banale weiße oder gelbliche Belag der Zähne an den Zahnfleischrändern, wegwischen. Um ihn zu gewinnen, muß man ihn mit Skalpell oder Spatel abkratzen, was allerdings wesentlich leichter gelingt als etwa das Abkratzen von Zahnstein. Der Belag wurde bisher von uns überwiegend (nämlich 4mal) an den Zähnen des Oberkiefers, seltener (1mal) auch des Unterkiefers gefunden, und zwar sind am meisten befallen die vorderen oberen Schneidezähne, während die seitlichen Schneidezähne und die Eckzähne ihn in viel geringerem Grade aufweisen, die Prämolaren gewöhnlich nur noch mit Spuren von kleinen roten Stippchen behaftet sind. Die Molaren waren immer ganz frei. Der Belag fand sich stets nur auf der Vorderfläche der Zähne und reichte nur wenig nach den seitlichen Partien hinüber, die Hinterfläche der befallenen Zähne erwies sich stets als frei. Das vorzugsweise Auftreten des Zahnbelages auf den Vorderflächen der Schneidezähne ist vielleicht in dem Sinne zu deuten, daß der den Zahnbelag hervorrufoende Mikroorganismus zu seinem Wachstum Sauerstoff nötig hat und daher auf den Zahnpartien am besten gedeiht, die am meisten mit dem Sauerstoff der Luft in Berührung kommen, was bei den vordersten Schneidezähnen wohl der Fall sein dürfte.

Den von uns konsultierten erfahrenen Zahnärzten, darunter Leiter großer Zahnkliniken mit einem außerordentlich reichen Patientenmaterial, war dieser Zahnbelag völlig unbekannt, einige Zahnärzte sprachen ihn als Zahnstein, andere als Blutfarbstoff an. Die von uns zu Rate gezogene klinische und bakteriologische Literatur über Zahn- und Mundkrankheiten enthielt ebenfalls nichts darüber. Wohl erwähnt die neue 4. Auflage von Preiswerck-Mayrhofers „Zahnheilkunde und Mundkrankheiten“ (Lehmanns medizinische Handatanten) weiße, grüne, braune und schwarze Zahnbeläge, deren Natur übrigens ebenfalls noch ziemlich unerforscht sei, aber von einem dem unseren gleichenden roten Zahnbelag ist in der Literatur nirgends etwas zu finden, so daß wir berechtigt sind, ihn als eine bisher unbekannte Erscheinung anzusehen.

Der purpurrote Zahnbelag wurde von uns seit dem Jahr 1925 bei unseren ambulanten Kranken häufiger gesehen und in 5 Fällen genauer beobachtet:

1) 50jähriger Schuhmacher, Patient der Med. Klinik Kiel, dort zur Beobachtung auf Darmblutung bzw. perniziöse Anämie. Gebiß ziemlich intakt und leidlich gepflegt; auf den oberen vorderen und seitlichen Schneidezähnen, in geringeren Maße auf den Eckzähnen purpurroter Zahnbelag von ähnlicher Form wie auf Fig. 1.

2) 19jähriger Jüngling, Pat. der Hautklinik wegen ausgedehntem Lupus vulgaris der Haut und Schleimhaut. Gebiß ziemlich intakt, aber sehr schlecht gepflegt, denn außer dem purpurroten Zahnbelag auf den Vorder- und Eckzähnen hat der Pat. an den Zahnfleischrändern noch einen schmierigen weißgelben Belag, der für mangelnden Gebrauch der Zahnbürste spricht.

3) Etwa 40jähriger Mann in der Med. Klinik wegen Magenbeschwerden in Beobachtung, starke Alveolarpyorrhö im Oberkiefer. Auf den Vorder- und seitlichen Schneidezähnen des Oberkiefers roter Belag.

4) 45jähriger gesunder Mann, Pat. der Hautklinik wegen Trichophytie. Völlig intaktes gesundes Gebiß, das er aber nach seinem eigenen Geständnis selten putzt. Dafür priemt er umsomehr. Auf den vorderen und seitlichen Schneidezähnen, den Eckzähnen und den ersten Prämolaren oben ein hervorragend schöner purpurroter Zahnbelag, nach dem die Farbskizze Fig. 1 angefertigt wurde. Auch die unteren Schneidezähne zeigen, wenn auch in viel geringerem Ausmaße, purpurrote festhaftende Fleckchen in der Nähe des Zahnfleischsaumes. Dieser Patient wurde bei der Sitzung der Nordwestdeutschen Dermatologenvereinigung (18. 4. 1926) vorgestellt und darüber kurz im Centralbl. f. Haut- u. Geschlechtskr. Bd. 40. S. 420 berichtet.

5) 22jähriger Student, Pat. der Hautklinik wegen Herpes facialis. Intaktes Gebiß bis auf einen kariösen Molaren. Auf den oberen vorderen Schneidezähnen etwa 1 mm breiter unregelmäßig streifenförmiger purpurroter Belag.

Alle diese Fälle wiesen übereinstimmend den später geschilderten mikroskopischen Befund auf. Mehrere andere Fälle von braunem und schmutzigorangelben Zahnbelag, bei denen wir anfangs dieselbe Aetiologie anzunehmen geneigt waren, erwiesen sich als nicht hierher gehörig, da sie mikroskopisch eine völlig andere Mikrobenflora aufwiesen.

Ueber längere Zeiträume beobachtet wurden unsere Patienten Nr. 2 und 4, bei denen zu Untersuchungs- und Kulturzwecken einige Male der Zahnbelag fast restlos mit dem Platinspatel abgekratzt wurde. Nach einigen Wochen bis Monaten war der Belag aber wieder gewachsen. Beide Patienten legen auf Mundpflege zugestandenermaßen keinen besonderen Wert. Bei Patient 5, einem Studenten, den die Eröffnung, daß sein Zahnbelag durch Pilze hervorgerufen sei, offensichtlich peinlich berührte und zu eifrigem Gebrauch der Zahnbürste veranlaßte, war der Belag bereits nach mehreren Tagen völlig verschwunden und blieb es anscheinend für die Dauer. Alle Patienten waren Raucher. Mit Rauchen scheint aber das Auftreten des Zahnbelages an sich wenig zu tun zu haben, sonst müßte er bei der großen Zahl der Raucher sicher wesentlich häufiger zur Beobachtung gelangen. Irgend eine gemeinsame Beziehung unter den 5 Patienten, die alle aus gänzlich verschiedenen Gegenden von Schleswig-Holstein stammten, haben wir nicht nachweisen können, insbesondere keine zu dem Grundleiden, wegen dessen sie in ärztliche Beobachtung kamen (Ulcus ventriculi, Anämie, Lupus vulgaris, Trichophytie, Herpes), denn der Zahnbelag wurde ja durchweg als Nebenfund erhoben und war keinem einzigen der Patienten, die davon nicht die geringsten Beschwerden hatten, überhaupt zum Bewußtsein gekommen.

Mikroskopische Untersuchung. Wenn man ohne vorherige Reinigung vom roten Zahnbelag etwas abkratzt und einen Objektträgerausstrich macht, so erhält man meist eine sehr bunte Mischflora von Mundspirochäten, grampositiven und gramnegativen Bakterien, dicken gramnegativen und dünneren grampositiven Fadenpilzen verschiedener Kaliber. Aber auch schon unter dieser Mischflora fällt ein besonderer Reichtum von grampositiven kurzen, vielfach leicht gekrümmten diphtheroiden Stäbchen mit Polkörperchen-ähnlichen Körnchen auf, ferner längere grampositive leicht gewundene Fäden, die in ihrem Verlauf häufig intensiv gefärbte Körnchen bzw. Protoplasmaverdichtungen enthalten; stellenweise sieht man diese Fäden in Abschnitte zerfallen, die,

von einander getrennt, den diphtheroiden Stäbchen vollständig gleichen, so daß die Annahme gerechtfertigt scheint, daß die diphtheroiden Gebilde sämtlich durch den Zerfall derartiger Fäden entstanden sind. Wenn man indessen erst nach sorgfältiger Reinigung der Zahnoberfläche — durch kräftiges Abspritzen mit Wasser oder physiol. NaCl-Lösung im Strahl einer Rekordspritze — etwas von dem Zahnbelag abkratzt und Ausstrichpräparate anfertigt, dann tritt die Mischflora völlig zurück und der Belag erweist sich fast in Reinkultur aus dichten Haufen von diphtheroiden Stäbchen bestehend, die unter einander nicht gleichmäßig stark die Gram-Färbung annehmen, vielfach zu Körnchen zu zerfallen scheinen, und unter denen nur spärlich Fadenbildungen sichtbar sind. Wenn man seine Aufmerksamkeit speziell auf die Fäden richtet, so kann man darunter solche entdecken, die seitliche echte Verzweigungen aufweisen, und zwar bald spitz-, bald rechtwinklig vom Hauptfaden abgehend. Die Pilzelemente zeigen bei hellster Beleuchtung im durchfallenden Licht gelegentlich einen diffus schwach gelblichen Schimmer. Anhäufungen des Farbstoffs in granulärer Form haben wir nicht beobachtet. Trotz der vielfach körnigen Struktur der diphtheroiden Kurzstäbchen ergibt die Neißer-Färbung keine Polkörperchenfärbung, sondern ein den Diphtheriebazillen ganz unähnliches Bild. Bei Ziehl-Neelsen-Färbung erweisen sich die Fäden und Diphtheroidstäbchen als nichtsäurefest. Mit der Möllerschen Sporen-Färbung lassen sich keine als Sporen (im Sinne der Bakteriensporen) ansprechbare Gebilde nachweisen. Bei Giemsa-Färbung färben sich die Fäden und Stäbchen blaßblau bis intensiv dunkelblau und zeigen in ihrem Innern zahlreiche intensiv rote bzw. tiefblau gefärbte Körnchen von Protoplasmaverdichtungen.

Nach dem mikroskopischen Bild der Ausstrichpräparate sprechen wir den roten Zahnbelag anscheinend in Reinkultur bildenden Mikroorganismus als *Streptothrixpilz* an. Er bildet Fäden mit echten Verzweigungen, die rasch in diphtheroide, kurzstäbchenähnliche und noch kleinere kokkenähnliche Gebilde und Körnchen zerfallen, was bekanntlich für die Gruppe der *Streptothrix*- bzw. *Aktinomyces* pilze charakteristisch ist. Sie färben sich auch wie diese grampositiv, sind im lebenden Präparat völlig unbeweglich. Auch in ihren Größenverhältnissen entsprechen sie durchaus der Gattung *Streptothrix* (*Aktinomyces*). Unsere Messungen ergaben Dickenwerte der grampositiven Pilzfäden und der Kurzstäbchen von 0,3 bis höchstens 1,0, die Länge der Fäden sowohl wie der Stäbchen ist äußerst variabel zwischen ganz lang und ganz kurz (siehe Fig. 2). Für die Pilznatur des Erregers spricht auch sein festes Haften auf der Zahnoberfläche im Gegensatz zu der bakteriellen Flora, die durch kräftiges Abspülen zum allergrößten Teil entfernbar ist, was beim roten Zahnbelag durchaus nicht gelingt. Für die Annahme, daß es sich um *Streptothrix* handelt, spricht ferner mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit die intensive Farbstoffbildung, denn es ist bekannt, daß gerade unter der *Streptothrix*- bzw. *Aktinomyces*gruppe Farbstoffbildner sehr häufig sind.

Um ein Bild über die Lagerungsverhältnisse des Pilzes auf der Zahnoberfläche zu gewinnen, erschien uns eine Untersuchung im Schnittpräparat wünschenswert. Herr Prof. Hentze-Kiel hatte die Freundlichkeit, uns bei einem Patienten den Belag mit dem Schmelzoberhäutchen in toto instrumentell abzuheben. Das gewonnene außerordentlich fragile, nur ganz dünn zusammenhängende Material wurde sofort in 10proz. Formalin gebracht, darin einige Stunden fixiert und dann in der üblichen Weise in Paraffin eingebettet, mit dem Mikrotom geschnitten und dann nach Gram gefärbt. Infolge der Dünne und Zerbrechlichkeit des Materials kam es natürlich zu Verfaltungen und Verschiebungen desselben, aber immerhin ließen sich die topographischen Verhältnisse der Pilzelemente darin einigermaßen beurteilen. Lockere und dichtere,

in annähernd derselben Richtung verlaufende Bündel von Myzelien (siehe Fig. 3 u. 4), die schwach gewunden sind und sich teilweise durchkreuzen, bilden die unterste Schicht der auf dem Schmelzoberhäutchen aufsitzenden und offenbar in demselben verankerten Pilzkolonien. Die Pilzfäden nehmen in den Schnitten den Gram-Farbstoff sehr ungleichmäßig an, neben intensiv gefärbten sieht man hellere und schließlich auch sehr viele gramnegative Hyphen. Es kann nicht ohne weiteres entschieden werden, ob die gramnegativen Fäden Jugend-, Alters- oder Degenerationsformen eines Pilzes darstellen, oder ob sie verschiedenen Pilzarten zugehören. Das Protoplasma der einzelnen Hyphen ist wiederum sehr ungleichmäßig gefärbt, man sieht innerhalb von intensiv gefärbten Zellmembranen als Hypheninhalt bald vakuolenartige hellere Bezirke, bald sehr chromatinreiche dunkel gefärbte Protoplasmaverdichtungen. Während die basale Myzelschicht sich anscheinend immer wieder erneuert, zerfallen die äußeren Hyphenenden mit fortschreitendem Wachstum zu diphtheroiden Stäbchen und kokkenartigen Gebilden und überlagern in dichten Massen die unteren Myzelien. Aus diesen dichten Massen von Stäbchen und Körnchen setzt sich fast ausschließlich der purpurrote Belag zusammen, denn, wie bereits erwähnt, sieht man in Ausstrichpräparaten des roten Zahnbelages — nach vorausgegangener sorgfältiger Reinigung desselben (s. Fig. 2) — ausschließlich die Stäbchenformen und Körnchen und nur bei längerem Suchen finden sich auch spärlich Pilzfäden. Das basale Myzelgeflecht, das in der palisadenartigen Anordnung eine gewisse Ähnlichkeit besitzt mit der basalen Pilzschicht in einem Favusskutulum der menschlichen Haut, enthält an manchen Stellen dem Kaliber und der Färbung nach so verschieden aussehende Pilzfäden, nämlich solche von der Dicke der diphtheroiden Stäbchen neben solchen von 2—3facher Dicke, daß es zweifelhaft ist, ob alle diese verschiedenen Formen der gleichen Pilzart zugehören oder ob es sich um eine Symbiose verschiedener Erreger handelt. Besonders auffallend sind vor allem die dicken Hyphenformen deshalb, weil sie fast durchweg gramnegativ gefärbt sind. Es ist a priori sehr wahrscheinlich, daß das im Schmelzoberhäutchen verankerte Myzelgeflecht verschiedene Hyphenpilzarten beherbergt, da auch normalerweise das Schmelzoberhäutchen derartige Pilze enthält (s. Fig. 64 in Blessing, Bakteriologie der Zähne und des Mundes). Es muß deshalb auch an die Möglichkeit gedacht werden, daß die ganze Erscheinung des purpurroten Zahnbelages das Produkt des symbiotischen Wachstums verschiedener Organismen ist, unter denen aber nach unseren Befunden der beschriebene Streptothrixpilz bei weitem dominiert, so daß man ihm wohl die Hauptrolle bei der Bildung des Zahnbelages zuerkennen muß. Es sei noch bemerkt, daß man auch innerhalb des Myzelgeflechtes in den Schnitten echte Verzweigungen an den grampositiven Hyphen nachweisen kann, an denen auch häufig Einschnürungen abwechselnd mit knotenartigen Verdickungen wahrnehmbar sind.

Kulturversuche. Nach vorausgegangener sorgfältiger Reinigung der Zahnoberfläche durch kräftiges Abspritzen mit steriler NaCl-Lösung wurde mit einem Platinspatel der rote Belag abgekratzt und dann in nicht zu kleinen Partikeln auf die verschiedenen Kulturmedien verteilt. Die Kulturen wurden überwiegend aerob, zum geringeren Teil auch anaerob angelegt. Als Nährsubstrate dienten Nährbouillon, 1 Proz. Traubenzuckerbouillon, Maltosepeptonwasser, Milch, Nähragar, Serumagar, Loeffler-Serum, Speichelagar, Blutagar, Maltosepeptonagar, Maltoseglyzerinpeptonagar, Traubenzuckerglyzerinpeptonagar, reiner 3proz. Peptonagar, Nährgelatine, 1 Proz. Traubenzuckergelatine. Auf allen diesen Nährböden wuchsen lediglich verunreinigende Begleitbakterien, unter denen sich niemals Farbstoffbildner, wie etwa *B. prodigiosus*, auch niemals rote Hefen befanden, aber auch bei wochenlanger Beob-

achtung keine Pilzkolonien. Nur ein eingiges Mal wurde nach 14 Tagen auf Loeffler-Röhrchen eine kleine stumpfgrau wachsende Kolonie gewonnen, die aus einem streptothrixartigen Myzelgeflecht bestand, das mit den fädigen Pilzelementen der Ausstrichpräparate große Aehnlichkeit hatte. Die Kolonie wurde in mehrere Partikel zerteilt und zur Fortimpfung auf Loeffler-Serum, Speichelagar und Blutagar verwandt. Der Pilz wuchs darauf aber nicht weiter, und alle weiteren Bemühungen zu seiner Kultivierung schlugen fehl, wobei daran erinnert sei, daß Pilze der Streptothrix- und Aktinomyzesgruppe vielfach außerordentlich schwer züchtbar sind. Aus der Erwägung heraus, daß der Mikroorganismus vielleicht Stoffwechselprodukte anderer Mikroben zu seinem Wachstum nötig habe, wurde aus einer Mischkultur der Mundflora des einen der Patienten ein sogenannter Ammennährboden hergestellt, aber auch darauf erfolgte kein Wachstum. Schließlich bezogen wir aus der hiesigen Zahnpoliklinik eine größere Anzahl frisch extrahierter Zähne, beimpften dieselben ohne irgendwelche Vorbehandlung sogleich mit einer kleinen Menge eben abgekratzten roten Zahnbelages, indem wir dieselbe ganz frisch auf die vordere Zahnfläche möglichst nahe dem Zahnhals auf das Schmelzoberhäutchen fest einrieben und dann die so beimpften Zähne (insgesamt einige 20 Stück) sofort in einer feuchten Kammer in den Brutschrank stellten. Trotz wochenlanger Weiterbeobachtung entstand auf den beimpften Zähnen keinerlei Belag. Weiterhin übertrugen wir den roten Zahnbelag eines unserer Patienten, der völlig gesund war und ein tadelloses Gebiß hatte, auf die vorderen Schneidezahnflächen von 3 verschiedenen Menschen, und zwar eines mit völlig intaktem Gebiß, eines anderen mit Alveolarpyorrhö, und eines dritten mit leichter Stomatitis mercurialis. Bei allen diesen 3 Patienten, die etwa 4 Wochen, der eine davon 6 Wochen, nachbeobachtet wurden, zeigte sich auch nicht eine Spur von rotem Zahnbelag. Es gelingt also auch nicht, die Pilze des Zahnbelages in der Mundhöhle anderer Menschen ohne weiteres zum Haften zu bringen. Schon die klinische Beobachtung, daß der Pilz sowohl in vernachlässigten Mundhöhlen wie bei tadellosem Gebiß vorkommt, weist darauf hin, daß der Zahnbelag keine gewöhnliche „Schmutzinfektion“ zu sein scheint, sondern daß offenbar ganz besondere, vorläufig unbekannte Bedingungen für das Wachstum dieses Mikroorganismus notwendig sind. Der Pilz stellt sich also als ein in seinen Wachstumsansprüchen außerordentlich differenziertes Lebewesen dar. Daß er mit dieser Eigenschaft unter den Mikroben der Mundhöhle nicht allein steht, wissen wir seit langem von der Schwierigkeit der Kultivierbarkeit anderer Mundpilze her. Gerade die banalsten unter ihnen, wie etwa Leptothrix, setzen ihrer künstlichen Züchtung bekanntlich den größten Widerstand entgegen. Das gleiche ist bekannt von den Mundspirochäten und manchen Bakterien. Sie bedürfen zum Wachstum wahrscheinlich gewisser Spaltprodukte, die in der Mundhöhle, — und wahrscheinlich auch nicht in jeder Mundhöhle in gleicher Weise —, durch Zersetzung der Nahrungsreste sich bilden, und die bei der experimentellen Züchtung in den in dieser Hinsicht natürlich viel zu primitiven Nährsubstraten sich nicht reproduzieren lassen, — was das Mißlingen der Züchtung verständlich macht. Ebenso wahrscheinlich ist es, daß viele Mundmikroben nur in Symbiose mit anderen Mikroorganismen gedeihen, und daß auch unser Streptothrixpilz dazu gehört. Immerhin sollte bei der bisher geringen Zahl von 5 genauer beobachteten Fällen, von denen jedoch nur 4 für Züchtungsversuche in Anspruch genommen werden konnten, die Hoffnung nicht aufgegeben werden, daß der Erreger des roten Zahnbelages sich doch noch züchten und genauer studieren lassen wird. Damit auch andere Untersucher sich an dieser Aufgabe beteiligen können, erfolgt jetzt schon die Veröffentlichung unserer Beobachtungen, deren Unvollkommenheit wir uns natürlich bewußt sind.

Daß der rote Zahnbelag irgendeine pathogene Bedeutung für die Mundhöhle hat, dafür konnten wir keinerlei Anhaltspunkte gewinnen. Ob eventuell ein sehr lange fortdauerndes jahrelanges Wachstum der Pilze auf der Zahnoberfläche schließlich zu einer Schädigung der Zähne führen kann, vermögen wir nicht zu beurteilen. Wahrscheinlich stellt die Veränderung lediglich eine harmlose mykotische Saprophytie dar, zurückzuführen auf zufällige Infektion mit einer besonderen Spezies der vielen Streptothrix-(Aktinomyzes-)Arten, die sich ja massenhaft in der menschlichen Umwelt finden und als obligate Bewohner der meisten Pflanzen-, Gemüse- und Obstarten, des Wassers und der Erde eigentlich ständig Gelegenheit haben, in den menschlichen Organismus einzudringen, wo man sie dann bekanntlich schon normalerweise in der Mundhöhle, auf den Tonsillen und im Darmkanal regelmäßig nachweisen kann.

Die klinisch-differentialdiagnostische Bedeutung des roten Zahnbelages sehen wir darin, daß er bei oberflächlicher Betrachtung zu Verwechslungen mit Zahnfleischblutungen Anlaß geben und zu der Annahme einer hämorrhagischen Diathese oder anderer Erkrankungen, die mit Zahnfleischblutungen einhergehen (Skorbut), führen kann. Schon die Feststellung der ziegelroten Farbe des mykotischen Zahnbelags schützt in den allermeisten Fällen vor solchen Täuschungen. Es sei noch ausdrücklich hervorgehoben, daß in den von uns beobachteten Fällen weder spontane Zahnfleischblutungen bestanden haben, noch eine besondere Fragilität der Gingiva gegen mechanische Insulte festzustellen war.

Erklärung der Tafelabbildungen.

Fig. 1. Mykotischer roter Zahnbelag.

Fig. 2. Streptothrixpilz aus mykotischem rotem Zahnbelag. Zeiß. Obj. $\frac{1}{12}$. Ok. 2.

Fig. 3. Myzelgeflecht im abgehobenen Schmelzoberhäutchen, mit Zerfall in Häufchen von diphthroiden Stäbchen (fixiert, Gramfärbung).

Fig. 4. Abgehobenes Schmelzoberhäutchen + roter Zahnbelag, basales Myzelgeflecht, überlagert von Haufen diphthroider Stäbchen und kokkenartigen Gebilden (fixiert und gefärbt wie Nr. 3, Zeiß $\frac{1}{12}$ Imm., Ok. 4).

Nachdruck verboten.

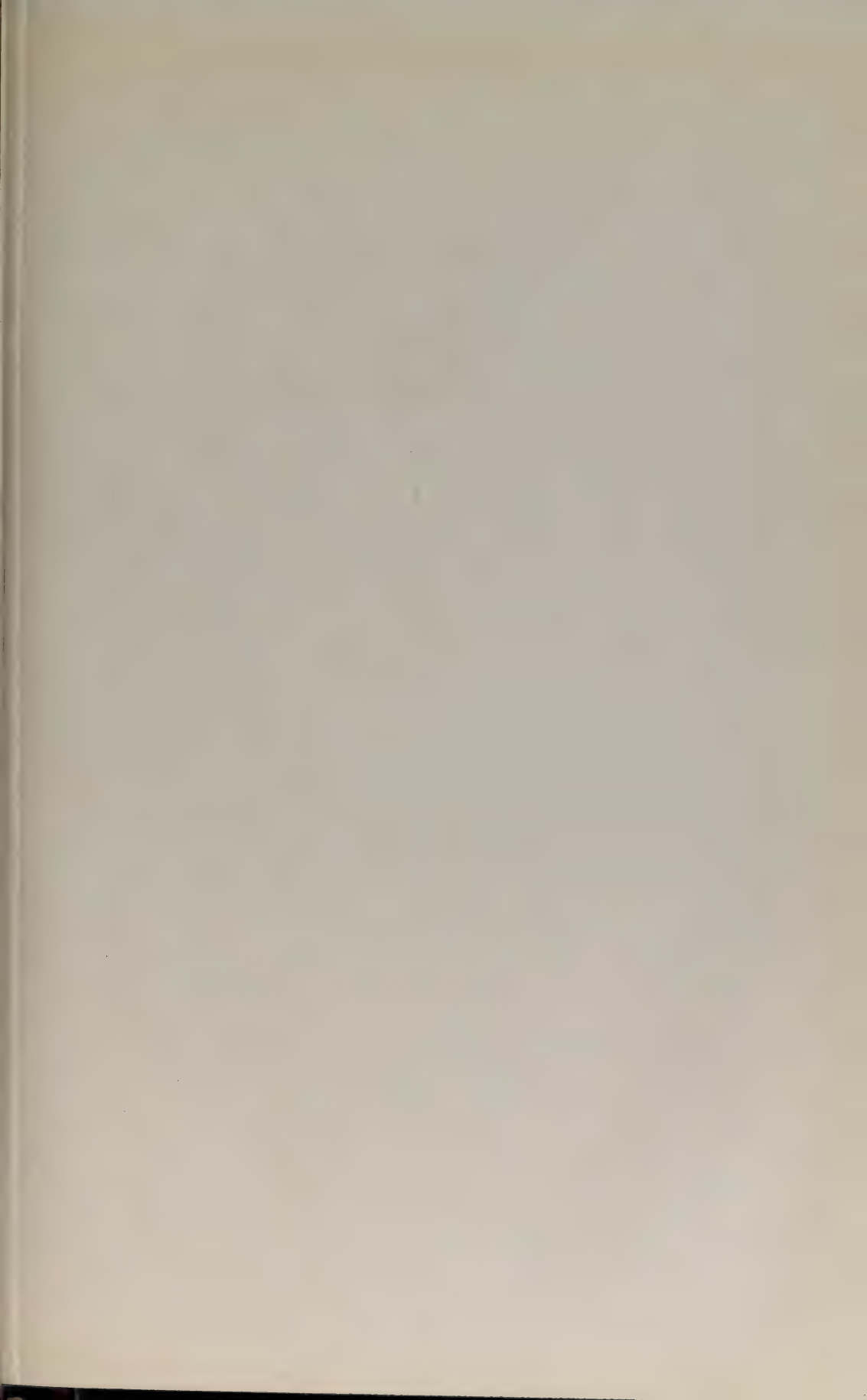
Zur Züchtung und Differenzierung der anaëroben Sporenbildner unter besonderer Berücksichtigung der Rauschbrand- und Pararauschbrandbazillen.

[Aus dem Hygienischen Institut der Anhaltischen Kreise, Dessau
(Direktor: Dr: Wolters).]

Von **K. L. Wolters** und **H. Dehmel**, techn. Assistentin.

Mit 7 Abbildungen im Text.

Die durch anaërobe Sporenbildner hervorgerufenen Erkrankungen bei Mensch und Tier haben besonders in den Kriegs- und Nachkriegsjahren außerordentliche Bedeutung erlangt und sind demgemäß Gegenstand zahlreicher wissenschaftlicher Arbeiten geworden. Die Züchtung der anaëroben Krankheits-erreger galt immer als eine der schwierigsten in der Bakteriologie, so daß außerordentlich widersprechende Ansichten über das Vorkommen der Anaërobier



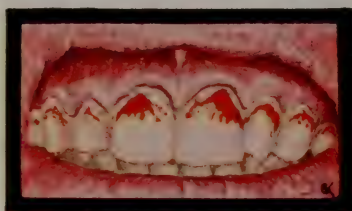


Abb. 1

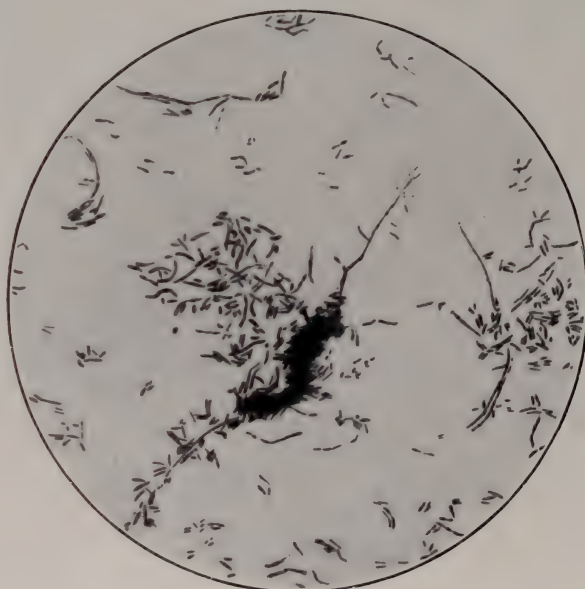


Abb. 2

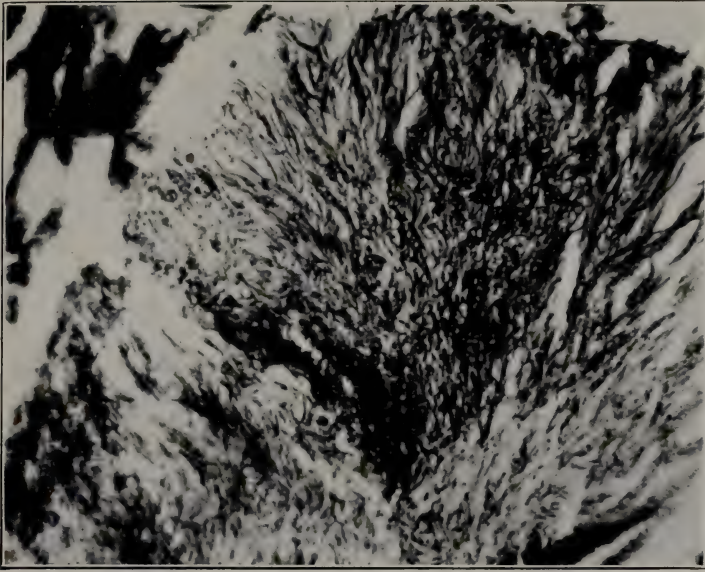


Abb. 3

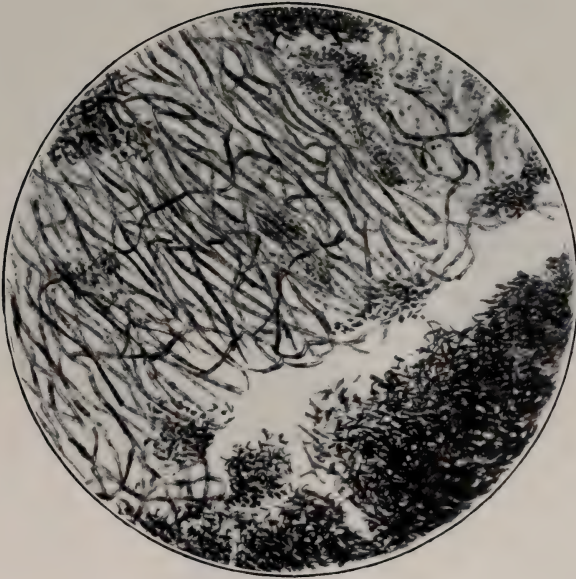


Abb. 4

und ihre Bedeutung für die einzelnen Krankheiten in der Literatur zu finden sind. In der Hauptsache sind diese Widersprüche wohl darauf zurückzuführen, daß viele Untersucher nicht mit Reinkulturen gearbeitet haben.

Die Züchtung der anaëroben Sporenbildner und ihre genaue Differenzierung ist erst durch die Arbeiten Zeisslers (1) wesentlich vereinfacht und erleichtert. Zeisslers Verfahren, auf Traubenzuckerblutagarplatten einzelne Oberflächenkolonien zu erhalten, ermöglicht die Unterscheidung vielgestaltiger Wuchsformen und die Eingruppierung in verschiedene Klassen. Die für die Veterinärmedizin wichtigsten pathogenen Anaërobier (der Rauschbrand- und der Pararauschbrandbazillus) zeigen nach den Angaben Zeisslers auf der Traubenzuckerblutagarplatte ein so verschiedenartiges Aussehen, daß sie unschwer voneinander zu unterscheiden sind. Für den Rauschbrandbazillus beim Rind und Schaf ist die Wuchsform IV (perlmutterknopfartig, weinblattförmig, flach im Zentrum einer hügeligen Anschwellung des Nährbodens eingebettet) allein spezifisch, während für den Pararauschbrandbazillus charakteristisch die Wuchsform III (schleierförmig mit mikroskopisch gefranstem Rand und meist zar- testen arabesken Ausläufern), möglich aber auch die Wuchsform IIa ist (rund, asbestflockig, wurzelförmig). Die Zeissler-Platte leistet zweifellos für die Differenzierung Hervorragendes, macht aber trotzdem andere Methoden nicht überflüssig, da die Wuchsformen nicht immer gleichmäßig typisch sind, sondern gelegentlich geringe Abweichungen zeigen. Die in der Zeisslerschen

Anaërobenreihe angegebenen Nährböden (Milch, Gelatine und Hirnbrei) leisten bei der Differen-

zierung der anaëroben Sporenbildner im allgemeinen gute Dienste, nicht aber gelingt es mit ihnen Rauschbrand- und Pararauschbrandbazillen zu bestimmen, da sich beide Bakterienarten in diesen 3 Nährmedien vollkommen gleich verhalten. In der Veterinärmedizin kommt jedoch der Differenzierung der Rauschbrand- und Pararauschbrandbazillen wegen der Entschädigungsfrage eine erhöhte Bedeutung zu. Wir haben daher versucht, ein Verfahren auszu- arbeiten, das eine schnelle und sichere Unterscheidung dieser beiden anaëroben Sporenbildner gewährleistet. Zu diesem Zwecke haben wir neben dem Wachstum auf der Blutplatte das Verhalten beider Bakterienarten auch in anderen Nähr- medien geprüft und außerdem versucht, mit den serologischen Methoden (Agglutination und Präzipitation) eine Typentrennung vorzunehmen.

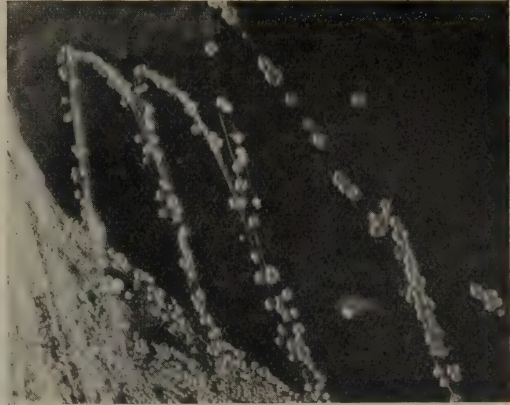


Fig. 1. Wuchsform IV, Rauschbrand.

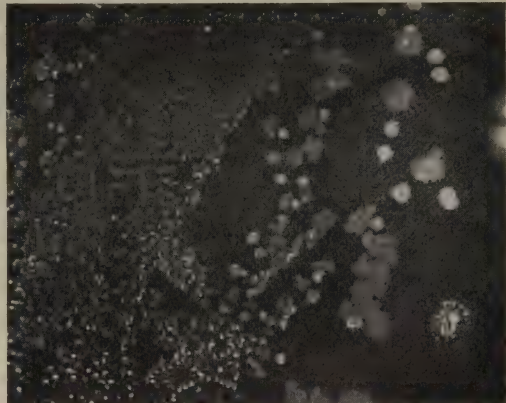


Fig. 2. Wuchsform IV, Rauschbrand.

Bevor wir auf Herstellung und Leistung der Nährsubstrate im einzelnen eingehen, erscheint es wichtig, die von uns geübte Technik des Verfahrens zur Schaffung optimaler Wachstumsbedingungen bekanntzugeben. Es unterliegt keinem Zweifel, daß gerade die nicht einheitliche Technik der Anaërobenzüchtung sehr viele Widersprüche in den Veröffentlichungen der einzelnen Autoren mit sich gebracht hat. Die anaëroben Bedingungen, unter denen die beimpften Kulturplatten und Röhrchen gehalten werden, sind bei den einzelnen beschriebenen Methoden nicht gleich, ganz abgesehen davon, daß vielfach recht umständliche Apparate hierfür in Gebrauch sind, die nur selten allen Anforderungen genügen.

Wir selbst haben anfangs mit dem Maassenschen Exsikkator gearbeitet, der sich im Gebrauch als sehr zeitraubend, kostspielig und unhandlich erwies. In neuerer Zeit wird vielfach zur Evakuierung lediglich eine elektrische Vakuumpumpe benutzt, mit der es gelingen soll, diese Schwierigkeiten zu beseitigen. Die alleinige Evakuierung mit der elektrischen Vakuumpumpe gewährleistet uns keine gleichmäßigen Wachstumsbedingungen. Wir benutzen daher seit



Fig. 3.

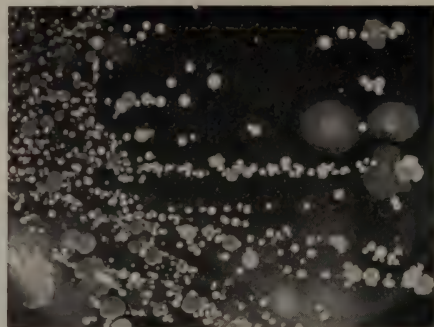


Fig. 4.

Fig. 3. Rauschbrandkolonien auf nicht genügend getrockneter Platte.

Fig. 4. Wuchsform IIa, Pararauschbrand.

2 Jahren einfache Weckgläser, die 12 Petri-Schalen und 20 Kulturröhrchen aufnehmen. Die Evakuierung erfolgt durch elektrisch betriebene Saugpumpe mittels Saugdüse zwischen abdichtenden Gummiringen; sie ist in einer $\frac{1}{2}$ Min. beendet und dient lediglich zum sicheren Verschuß der Gläser. Von dem Verfahren der Restsauerstoffabsorption durch alkalisches Pyrogallol, das teuer und unbequem in der Anwendung ist, sind wir abgekommen und verwenden jetzt das von Kollath (2) empfohlene Natriumhydrosulfit + Kalilauge. Die ursprünglich für Züchtung im Reagenzglas angegebene Methode (Doppelröhrchen) haben wir unter Berechnung der Mengenverhältnisse auf Weckgläser übertragen. Für Doppelröhrchen mit Rauminhalt von 55 ccm ist $\frac{1}{6}$ g Natriumhydrosulfit in Substanz notwendig, das im Verhältnis 1 : 5 (20proz.) in 10proz. Kalilauge gelöst wird. Für Weckgläser mit Rauminhalt von 3500 ccm werden 10 g Natriumhydrosulfit in 50 ccm 10proz. Kalilauge kurz vor der Evakuierung gelöst. Die Lösung wird vor Beschickung des Weckglases eingefüllt. Die beimpften Kulturplatten werden durch einen Einsatz (im Notfall umgekehrte Petri-Schale) vor dem Eintauchen in die Flüssigkeit geschützt. Mit dieser Methode sind ohne Schwierigkeit in kürzester Zeit größere Reihenversuche anzusetzen. Die anfänglich beobachtete Nebenerscheinung des Auftretens

größerer Mengen Schwefelwasserstoff, der bei vollem Abschluß von Luft selbst bei Brutschranktemperatur in sehr störendem Maße frei wird, läßt sich durch Zusatz von ca. 1 g Ferrosulfat zum Absorptionsgemisch wirksam hintanhaltend. Der entstehende Schwefelwasserstoff wird hierbei in Form von schwarzem Ferrosulfid gebunden.

Zum Trocknen der nach Originalvorschrift hergestellten Traubenzuckerblutagarplatten empfiehlt Zeissler vor der Beimpfung die 2tägige Aufbewahrung bei Zimmertemperatur, wobei jedoch leicht eine Verunreinigung durch Luftkeime stattfindet. Wir benutzen daher die von Zeller (3) geübte Methode über Chlorkalzium, die den außerordentlichen Vorteil hat, daß bereits nach 1 Std. eine genügende Trockenheit des Nährbodens erreicht ist, der nunmehr beimpft werden kann. Die Verwendung gut und gleichmäßig getrockneter Nährböden ist für die Beurteilung der Wuchsformen auf der Zeissler-Platte ausschlaggebend. Auf nicht genügend getrockneten Platten wachsen meist Bazillenrasen, die eine Beurteilung unmöglich machen. Wir beimpfen die Zeissler-Platten nicht mit dem Drigalski-Spatel, sondern mit der Platinöse und zwar nur bis zur Hälfte. Hierdurch erreichen wir an den Randpartien die Bildung von Einzelkolonien und somit eine bessere Beurteilung der Wuchsformen. Ganz besonders bei Pararauschbrandbazillen, die leicht zum Rasenwachstum neigen, erweist sich dies als sehr zweckmäßig. Häufig ist zu beobachten, daß die Pararauschbrandkolonien bis zur Hälfte der Platte in Verfolg des Impfstriches deutlich in der Wuchsform IIa wachsen und sich dann über die unbeimpfte Plattenhälfte schleierförmig in der Wuchsform III ausbreiten. Abimpfungen von beiden Formen in Leberbouillonröhrchen und wiederholte Verimpfung auf Zeissler-Platten ergab dasselbe Bild, es handelte sich also nicht um 2 Bazillentypen, sondern um 2 verschiedene Wachstumsarten desselben Bazillus. Die Entwicklung der einzelnen Kolonien ist von der Menge der ausgesäten Keime abhängig. Bei Aussaat vieler entwicklungsfähiger Keime tritt eine gegenseitige Wachstumshemmung ein, wodurch die gedrungenen, hochstehenden Kolonien mit kurzen Ausläufern entstehen (Wuchsform IIa, s. Fig. 4), während die Keime, die Platz zur Ausdehnung haben, ihre charakteristischen arabesken Ausläufer ausschicken (Wuchsform III, s. Fig. 5). Die Neigung zur Rasenbildung haben wir auch bei Rauschbrandbazillen stets auf nicht genügend getrockneten Platten beobachtet, wodurch die Möglichkeit einer Verwechslung mit Wuchsform IIa des Pararauschbrandbazillus (s. Fig. 3) besteht. Bei wiederholter

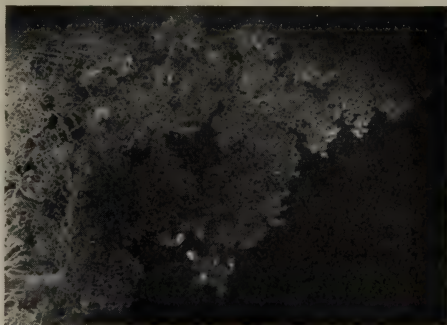


Fig. 5. Wuchsform III, Pararauschbrand.



Fig. 6. Wuchsform IIa und III, Pararauschbrand.

Prüfung auf besser getrockneten Zeissler-Platten zeigten sich jedoch stets typische Kolonien der Wuchsform IV (s. Fig. 1). Allerdings haben wir die hügelige Anschwellung des Nährbodens um die Rauschbrandkolonien auf der Schafblut-Traubenzuckeragarplatte meist vermißt (desgl. Seelemann (4) und Zeller (1)). Auch bei den von Herrn Dr. Zeissler, Vorsteher des Untersuchungsamtes der Stadt Altona, uns liebenswürdigerweise zu Vergleichszwecken überlassenen Schaf- und Rinderrauschbrandreinkulturen wurde die Bildung von Nährbodenhügeln auf der Schafblutplatte nicht beobachtet. Trotz des Fehlens dieses von Zeissler angegebenen Artmerkmals waren die Rauschbrandkolonien mit der Wuchsform IIa des Pararauschbrandbazillus bei einiger Übung nicht zu verwechseln. Bei den Rauschbrandkolonien wurde als besonderes Charakteristikum fast stets eine mehr oder weniger starke Wallbildung des Kolonienrandes festgestellt, während das Zentrum der Kolonie eingesunken erschien (s. Fig. 1). Seltener wuchsen die Rauschbrandkolonien kokardenförmig (mit schräg abfallenden Rändern). Stets zeigten sie jedoch, besonders nach 3—4 Tagen ein feingekörntes, mattes Aussehen gegenüber der Wuchsform IIa des Pararauschbrandbazillus mit glatter, glänzender Oberfläche. Nach unserer Auffassung gelingt es dem geübten Beobachter mit hoher Wahrscheinlichkeit schon nach den Wuchsformen auf der Zeissler-Platte Rauschbrand- bzw. Pararauschbrandkolonien zu erkennen. Allerdings ist Voraussetzung, daß die verdächtigen Kolonien abgeimpft und nach Anreicherung in Leberbouillon oder Hirnbrei abermals auf Zeissler-Platten überimpft, typische Wuchsformen ergeben. Für die Sicherung der Diagnose ist es trotzdem vorteilhaft, ähnlich wie bei der Typhus-Paratyphusgruppe differenzierende Nährböden einzuführen und so eine sichere Unterscheidung beider Bakterienarten zu ermöglichen.

Neben den von Zeissler für die Anaërobenreihe empfohlenen Nährsubstraten (Blutplatte, Hirnbrei, Milch, Gelatine) prüften wir folgende Nährsubstrate auf ihre differenzierenden Eigenschaften.

- a) hocharstarrtes Rinderserum,
- b) Agar- und Traubenzuckeragar-Schüttelröhrchen,
- c) Schrägagar und Serumagar (anaërob) nach Manning (5),
- d) Tarozzimilch nach Rottgardt (6).

Bei Herstellung der Nährsubstrate wurde die gleichmäßige Zusammensetzung und sachgemäße Sterilisation als besonders wichtig erkannt. So nur ist es möglich, Fehlerquellen auszuschalten, die bei vergleichenden Untersuchungen leicht zu irrtümlichen Schlußfolgerungen Veranlassung geben können. Es wurden 67 Rauschbrandstämme, (52 vom Schaf, 15 vom Rind), 43 Pararauschbrandstämme (32 vom Schaf, 11 vom Rind), 8 Stämme des Fränkelschen Gasbrandbazillus, 4 Stämme des *Bac. putrificus verrucosus*, 3 Stämme des *Bac. sporogenes* Metschnikoff, 2 Stämme des Tetanusbazillus und 1 Novyscher Bazillus des malignen Oedems auf diese Weise 2mal geprüft.

Herstellung und Leistung der einzelnen Nährsubstrate.

1. Traubenzuckerblutagarplatte:

Die nach Originalvorschrift hergestellte Traubenzuckerblutagarplatte in Verbindung mit der von uns geübten Beimpfungs- und Züchtungsmethode hat nach 48stünd. Bebrüten im allgemeinen Übereinstimmung mit den von Zeissler eingehend beschriebenen Wuchsformen der anaëroben Sporenbildner ergeben. Sie stellt daher ein unentbehrliches Hilfsmittel zum Nachweis der anaëroben Krankheitsreger dar, selbst unter Berücksichtigung, daß beim Wachstum der Rauschbrandbazillen geringfügige Abweichungen vorkommen

(Fehlen des Nährbodenhügels). Für die Anaërobentechnik ist sie von überragender Bedeutung, weil es mit ihr gelingt, Reinkulturen zu gewinnen und somit eine weitere Diffrenzierung zu ermöglichen. Die Zeissler-Platte ist grundlegend geworden für die experimentelle Erforschung der anaëroben Krankheitserreger, insbesondere der Rauschbrand- und Pararauschbrandbazillen bei Rind und Schaf.

2. Hirnbrei nach Kovács: (7)

Herstellung wie Hirnbrei nach Hibler, nur mit der Abänderung, daß anstelle Leitungswasser 0,05proz. Ferrosulfatlösung zu der durch Gaze gepreßten Hirnmasse (Kalbshirn) gegeben wird. In diesem mit Ferrosulfat versetzten Hirnbrei geht das Wachstum und die Versporung der Anaërobier schneller vor sich. Außerdem tritt eine intensivere Schwarzfärbung des Substrates durch die Alkalibildner ein, wodurch jede Verunreinigung der Rauschbrand- und Pararauschbrandstämme durch *Putrificus*bazillen leicht zu erkennen ist. Zur Anreicherung und für die Differenzierung der pathogenen und apathogenen Anaërobier im allgemeinen (Prüfung auf Schwärzung und Sporenresistenz) ist der Nährboden unentbehrlich.

- | | |
|-------------------|----------------------------------|
| 3. Sterile Milch. | } Herstellung nach Zeissler: (1) |
| 4. Gelatine. | |

Rauschbrand- und Pararauschbrandbazillen bewirken langsame Gerinnung der Milch (2—14 Tage) und Verflüssigung der Gelatine. Für die Differenzierung dieser beiden Bakterienarten ohne Bedeutung, sind jedoch diese Nährmedien zur Abgrenzung anderer Anaërobier mit Vorteil zu verwenden.

5. Hoherstarrtes Rinderserum:

Frisch abgesetztes, keimfrei filtrierte Rinderserum wird in Reagensröhrchen etwa 8 cm hoch abgefüllt und an 3 aufeinanderfolgenden Tagen je 3—4 Std. bei einer Temperatur von 63—65° gehalten. Das so erstarrte Rinderserum muß goldgelb, klar und durchsichtig sein.

Der Rauschbrandbazillus wächst im hoherstarrten Rinderserum nach 48 Std. in kleinen kugeligen Kolonien längs des Stichkanals ohne Gasbildung und Serumverflüssigung. Nach 8—10 Tagen wird das Wachstum etwas stärker und dichter, es bilden sich einzelne Gasblasen, in denen sich nach 14 Tagen bis 3 Wochen etwas verflüssigtes Serum ansammelt; eine stärkere Serumverflüssigung tritt auch bei längerer Bebrütungsdauer nicht ein.

Der Pararauschbrandbazillus zeigt nach 48 Std. ein sehr üppiges Wachstum faseriger Kolonien, die wie Fäden vom Stichkanal ausgehen, während der Nährboden von zahlreichen Gasblasen durchsetzt ist. Nach 5 Tagen tritt vermehrte Gasbildung mit teilweiser Verflüssigung des Serums auf, das jedoch glasklar, durchsichtig und geruchlos ist. Eine völlige Verflüssigung findet auch bei längerer Beobachtungszeit bis zu 4 Wochen nicht statt.

Der Fränkelsche Gasbrandbazillus verflüssigt das Rinderserum innerhalb 5—7 Tagen fast völlig, wobei ein deutlicher Geruch von Schwefelwasserstoff auftritt.

Die hirnbreischwärenden Anaërobier verflüssigen das Rinderserum schon in 2 Tagen vollständig unter Schollenbildung. Das verflüssigte Serum ist weißlich-trübe, undurchsichtig, von putridem Geruch.

Zur Differenzierung von Rauschbrand und Pararauschbrand eignet sich dieser Nährboden sehr gut, da bereits nach 2 Tagen der Unterschied im Wachstum deutlich zu Tage tritt und nach 5 Tagen am stärksten ausgeprägt ist (s. Fig. 7).

6. Schüttelkulturen:

1) 1,5proz. klar filtrierter Rindfleischagar (7,6 pH) in Reagensröhrchen etwa 8 cm hoch abgefüllt.

2) Traubenzuckeragar: derselbe Agar mit Zusatz von 1 Proz. Traubenzucker.

Zur Unterscheidung von Rauschbrand- und Pararauschbrandbazillen sind die Schüttelkulturen brauchbare Nährböden. In gewöhnlichem Schüttelagar wachsen Rauschbrandbazillen nicht, Pararauschbrandbazillen als faserige Kolonien. Sobernheim (8), Uchimura (9) und Zeller (3) sahen in Traubenzuckeragar kein Wachstum des Rauschbrandbazillus. Wir beobachteten dagegen Wachstum der Rauschbrandbazillen sowohl vom Rind als vom Schaf in mehreren Fällen, doch nur dann, wenn der Traubenzuckeragar vorsichtig im Kochschen Dampftopf sterilisiert war (genau 2mal je 30 Min.). Pararauschbrandbazillen wachsen sehr üppig in Traubenzuckerschüttelagar und sprengen den Nährboden

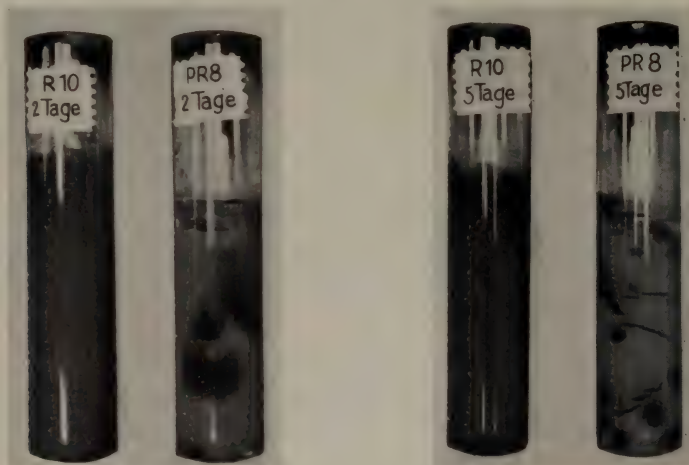


Fig. 7a.

Fig. 7b.

Fig. 7a und Fig. 7b. Differenzierung von Rauschbrand- und Pararauschbrandbazillen in sterilem Rinderserum.

meist unter Gasbildung. Bei höherer Sterilisation wächst Rauschbrandbazillus nicht, Pararauschbrandbazillus gut, jedoch häufig ohne Gasbildung. Das Verhalten der übrigen geprüften Anaerobier in diesen Nährböden ist aus der Tabelle ersichtlich.

7. Schrägröhrchen.

Auf gewöhnlichem 3proz. Rindfleischagar (7,6 pH) haben wir bei anaerober Bebrütung im Gegensatz zu Manninger vereinzelt Wachstum von Rauschbrandbazillen beobachtet (bei 6 Schaf- und 2 Rinderrauschbrandstämmen). Die Kolonien sind rund, zart, glasig schimmernd, mit leicht erhabenem Rand. Pararauschbrandbazillen wachsen auf Schrägagar gut und gleichen den Wuchsformen III und IIa auf der Zeissler-Platte.

Auf Serumagar (3proz. Rindfleischagar mit Zusatz von sterilem Rinderserum im Verhältnis 3:1) wachsen Rauschbrand- und Pararauschbrandbazillen üppig. Die Wuchsformen ähneln denen auf der Zeissler-Platte.

Tarozzimilch: (Herstellung nach Rottgardt).

Als gutes Nährmedium und Differenzierungsmittel empfiehlt Rottgardt Milch mit Zusatz von gekochten Fleischstückchen. Rauschbrandbazillen

sollen diese Milch in 3—30 Tagen zur Gerinnung bringen, ohne jedoch das weiche Koagulum aufzulösen, Pararauschbrandbazillen dagegen schon eine Gerinnung nach 18—40 Std. bewirken und eine allmähliche Auflösung des schwammigen Koagulums unter Ausscheidung einer wässerigen Flüssigkeit.

Bei wiederholter Prüfung dieses Nährmediums mit 46 Rauschbrand- und 23 Pararauschbrandstämmen konnten wir die Befunde Rottgardts im allgemeinen bestätigen. Eine geringe Abweichung war insofern festzustellen, als die Gerinnung bei den Pararauschbrandstämmen nicht nach 18 Std., sondern nach 24—48 Std., bei 5 Stämmen erst nach 3 Tagen nachzuweisen war. Die Auflösung des Kaseins erfolgte spätestens am 4. Tage und zeigte die von Rottgardt angegebenen Merkmale. Bei den Rauschbrandstämmen trat dementsprechend die Gerinnung auch später ein, und zwar in einem Zeitraum von 7—40 Tagen. Eine Auflösung des Kaseins erfolgte auch bei längerer Bebrütungszeit nicht. 20 Stämme zeigten auch nach 60 Tagen noch keine Gerinnung, trotzdem üppiges Wachstum der Rauschbrandbazillen in der Tarozzimilch durch Kontrolle auf Blutplatten nachzuweisen war. Auf Grund dieser Befunde eignet sich die Tarozzimilch sehr gut zur Differenzierung von Rauschbrand- und Pararauschbrandbazillen.

Der Fränkelsche Gasbrandbazillus bringt die Tarozzi-Milch bereits nach 18 Std. zur Gerinnung unter teilweiser Verflüssigung des schwammigen Koagulums und Ausscheidung einer wässerigen klaren Flüssigkeit. Eine weitere Veränderung des Nährbodens erfolgt auch bei längerer Bebrütungszeit nicht. Die hirnbreischwärenden Anaërobier außer Tetanus bringen die Tarozzi-Milch in 24—48 Std. zur Gerinnung und bewirken dann eine mehr oder weniger schnelle völlige Auflösung des weichen Koagulums in eine schmutziggelbe trübe Flüssigkeit von putridem Geruch (siehe Tabelle).

Leberbouillon nach Zeissler:

Anstatt Meerschweinchenleber verwenden wir Rinderleber, die sich im Gebrauch gut bewährt. Für die Differenzierung bedeutungslos, ist die Leberbouillon zur Keimanreicherung und bei Verarbeitung von frischem und getrocknetem Untersuchungsmaterial unentbehrlich. Außerdem wird sie zur Herstellung von Kulturfiltraten verwendet.

Blutbouillon nach Kitt: (10)

Die Blutbouillon ist als Nährmedium für Anaërobier besonders geeignet, kommt für die Differenzierung jedoch nicht in Frage und wird von uns nur zur Herstellung von Dauerkulturen verwendet.

Nach Miessner (11) sollen auf der mit Blut immunisierter Tiere hergestellten Traubenzuckerblutagarplatte Wachstumshemmungen in der Weise deutlich in Erscheinung treten, daß bei Blutzusatz eines gegen Rauschbrand immunisierten Rindes das Wachstum von Rinderrauschbrandbazillen deutlich, das von Schafrauschbrandbazillen weniger stark gehemmt wird. Bei Verwendung von Blut gegen Schafrauschbrand immunisierter Schafe ist dagegen das Wachstum von Schafrauschbrandbazillen stärker gehemmt. Wir haben versucht, dieses Verfahren zur Abgrenzung von Rauschbrand- bzw. Pararauschbrandbazillen des Schafes zu verwerten, indem wir zur Herstellung der Blutplatten einerseits Blut eines gegen Schafrauschbrand und andererseits Blut eines gegen Schafpararauschbrand immunisierten Hammels verwendeten. Außerdem wurden zur Kontrolle Blutplatten mit Blutzusatz eines nicht vorbehandelten Schafes

beimpft. Die Versuchsanordnung wurde so getroffen, daß je ein Rauschbrandbazillenstamm vom Rind und Schaf und je ein Pararauschbrandbazillenstamm derselben Tierarten auf 3 verschiedene Blutplatten verimpft wurden: 1) mit Blutzusatz des gegen Rauschbrand immunisierten Hammels, 2) mit Blutzusatz des gegen Pararauschbrand immunisierten Hammels, 3) mit Normalhammelblut. Vier in dieser Richtung angestellte Versuche ergaben so geringe Wachstumsunterschiede, daß wir diese Methode für die Differenzierung des Rauschbrand- und Pararauschbrandbazillus nicht für geeignet halten.

Fassen wir die vorstehenden Differenzierungsversuche mit den verschiedenen geprüften Nährsubstraten zusammen, so ergibt sich folgende Tabelle:

Ta

Anzahl der gepr. Stämme	Art der Stämme	Wuchsform auf d. Zeißlerplatte	Hirnbrei nach Kovacs	Hoherstarrtes Rinderserum	Tarozzi-Milch
67	Rauschbrandbazillus	IV	keine Schwärzung, später Rötung	W. kleiner kugliger Kol., am Stichkanal ohne Verfl.	keine Ger. oder Ger. in 7—40 Tagen, keine Auflösung des Kaseins
43	Pararauschbrandbazillus	III u. II a	keine Schwärzung, später Rötung	üppiges W. lockerer Kol. Teilweise klare Serumverfl.	Ger. in 24—48 Std., Auflösung des Kaseins bis zum 4. Tage
1	Novyscher Baz. des malignen Oedems	II a	keine Schwärzung	sehr langsame, klare Verflüssigung	wenig W. ohne Veränderung der Milch
8	Fränkelscher Gasbrandbazillus	I	keine Schwärzung	gutes W., klare Verflüssigung	Ger. und Auflösung des Kaseins in 18 Std.
3	Bac. sporogenes Metschnikoff	II b	Schwärzung der oberen Partien	klare Verflüssigung, Fäulnisgeruch	Ger. in 24—48 Std., völlige Peptonisierung in 5—6 Tagen. Gelblich trübe, putrider Geruch
2	Tetanusbazillus	III	Schwärzung	wenig W., langsame Verflüssigung	kein oder wenig W. ohne Veränderung der Milch
4	Bac. putrificus verrucosus	VI	völlige intensive Schwärzung	völlige trübe Verflüssigung mit Schollenbildg. und Fäulnisgeruch	Ger. in 24 Std. Völlige Peptonisierung in 48 Std. Gelb, trübe, putrider Geruch

W. = Wachstum. Verfl. = Verflüssigung. Ger. = Gerinnung.

Zur Abgrenzung von Rauschbrand- und Pararauschbrandbazillen verwenden wir daher als Anaërobenreihe:

- 1) Traubenzuckerblutagarplatte.
- 2) Hirnbrei.
- 3) Steriles hoherstarrtes Rinderserum.
- 4) Tarozzimilch.
- 5) Schüttelkulturen a) gewöhnlichen Agar, b) Traubenzuckeragar.

die auch für die Differenzierung der übrigen Anaërobier verwendbar ist. Außer diesen Nährböden ist die Prüfung der Sporen auf Hitzeresistenz notwendig.

Um einen Ueberblick über die Brauchbarkeit der serologischen Methoden zur Differenzierung von Rauschbrand und Pararauschbrand zu gewinnen, haben wir schließlich mit der Präzipitation und Agglutination entsprechende Versuche angestellt.

Die Präzipitation führte bei Verwendung von Muskelextrakt von an Rauschbrand bzw. Pararauschbrand gefallenen Tieren zu keinem befriedigenden Ergebnis. Es gelang lediglich mit Kulturextrakten eine anscheinend spezifische Präzipitation auszulösen. In unserem Versuche beobachteten wir jedenfalls, daß präzipitierendes Rauschbrandserum mit Rauschbrandbazillenextrakten einwandfrei positiv reagierte, während Kulturextrakte von Pararauschbrand-

belle I.

Schüttelkulturen		Schrägröhrchen anaërob		Sporen- resistenz gegen Siedehitze
gewöhnlicher Agar	Traubenzuckeragar	gewöhnl. Agar	Serumagar	
kein W.	kein oder wenig W. ohne Gasbildung	meist kein W., ver- einzelt W. F. IV	gutes W., Form IV	unter 40 Min.
gutes W.	gutes W., Sprengung des Agars	gutes W. mit Aus- läufern	gutes W. mit Aus- läufern	unter 40 Min.
gutes W.	gutes W. mit Gas- bildung	runde flache Kol.	gutes W. runder flacher Kol.	über 40 Min.
gutes W. mit Gasblasen	gutes W., starke Sprengung des Agars	gutes W., runder bläul. glas. Kol.	gutes W. runder bläul. glas. Kol.	—
gutes W.	gutes W., Sprengung des Agars	bläuliche Kol. mit kleinen Ausläufern	gutes W. bläul. Kol. mit kleinen Aus- läufern	über 40 Min.
gutes W.	gutes W., geringe Sprengung des Agars	kein oder wenig W. zarter Kol. W. Form III	wenig W. mit Aus- läufern	über 40 Min.
starkes W. mit Gas- blasen	gutes W., starke Sprengung des Agars	gutes W. gelber zäher Kol. mit spitz- zackigen Aus- läufern	gutes W. gelber zäher Kol. mit spitz- zackigen Aus- läufern	über 40 Min.

bazillen negative Reaktion gaben. In gleicher Weise gab präzipitierendes Pararauschbrandserum mit Pararauschbrandbazillenextrakt positive und mit Rauschbrandbazillenextrakt negative Reaktion. Die Präzipitationsmethode scheint daher nur zur Differenzierung von Bakterienreinkulturen praktisch verwendbar.

Zur Agglutination verwendeten wir ein monovalentes Rauschbrandserum vom Schaf (Titer 6400) und ein monovalentes Pararauschbrandserum, gleichfalls vom Schaf (Titer 4000). Die Testflüssigkeit zur Agglutination stellten wir folgendermaßen her: wir beimpften Leberbouillon ohne Stücke mit einer Oese Hirnbreikultur. Nach 48stünd. Wachstum wurde die Leberbouillon von den Bakterien abzentrifugiert, diese selbst mit 0,5proz. Karbol-Kochsalzlösung

aufgeschwemmt und 1 Std. mit sterilen Glasperlen geschüttelt. Dies erwies sich als notwendig, da die ungeschüttelten Bakterien meist Spontanagglutination zeigten. Nach Filtration durch Filtrierpapier waren die Bakterienaufschwemmungen gebrauchsfertig.

Von 22 Rauschbrandstämmen wurde 1 Stamm von dem Rauschbrandserum nur in der Verdünnung 1:100, 2 Stämme bis zur Verdünnung 1:200, 16 Stämme in der Verdünnung von 1:800—2000 und 2 Stämme bis zur Verdünnung 1:3200 agglutiniert. Nur Stamm 5, der zur Serumherstellung diente, wurde bis zur Titergrenze agglutiniert. Das vergleichsweise mitgeprüfte Pararouschbrandserum ergab bei 8 Rauschbrandstämmen keine Agglutination während 14 Stämme in der Verdünnung 1:100 mitagglutiniert wurden. Die Prüfung des Pararouschbrandserums mit 8 Pararouschbrandstämmen ergab im allgemeinen Agglutinationswerte bis 1:2000, von dem vergleichsweise mitgeprüften Rauschbrandserum wurden jedoch alle Stämme bis zur Serumverdünnung 1:800 oder 1000 mitagglutiniert (s. Tabelle).

Tabelle II.

Stamm	Rauschbrandserum										Pararouschbrandserum								Normal- serum 1: 100	
	1: 100	1: 200	1: 400	1: 800	1: 1000	1: 1600	1: 2000	1: 3200	1: 4000	1: 6400	1: 100	1: 200	1: 400	1: 800	1: 1000	1: 1600	1: 2000	1: 3200		1: 4000
R. 1	+	+	+	+	+	+	+	.	.	.	+	—
R. 2	+	+	+	+	+	+	—	—
R. 3	+	+	+	+	+	+	+	.	.	.	—	—
R. 4	+	+	+	+	.	+	+	.	.	.	+	—
R. 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
R. 6	+	+	+	+	+	+	+	.	.	.	+	—
R. 7	+	+	+	+	+	+	+	.	.	.	+	—
R. 8	+	—	—
R. 9	+	+	+	+	+	—	—
R. 10	+	+	+	+	+	+	+	—
R. 11	+	+	+	+	+	±	—
R. 12	+	+	+	+	+	+	+	—
R. 13	+	+	+	+	+	+	+	+	.	.	+	—
R. 14	+	+	+	—	—
R. 15	+	+	+	+	+	+	+	+	.	.	+	—
R. 16	+	+	+	—	—
R. 17	+	+	+	+	+	+	—
R. 18	+	+	+	+	±	—
R. 19	+	+	+	+	+	+	—	—
R. 20	+	+	+	+	+	—	—
R. 21	+	+	+	+	+	+	+	.	.	.	+	—
R. 22	+	+	+	+	+	+	+	.	.	.	+	—
PR. 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
PR. 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
PR. 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
PR. 4	+	+	+	+	+	+	+	.	.	.	+	+	+	+	—
PR. 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
PR. 6	+	+	+	+	+	+	+	.	.	.	+	+	+	+	—
PR. 7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
PR. 8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	.	+	+	+	+	+	—

R. = Rauschbrandstämmen. PR = Pararouschbrandstämmen.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß die Agglutination bei Verwendung hochwertiger Immunsera zur Differenzierung mit herangezogen werden kann und für Rauschbrand spezifisch ist. Dagegen ist es nicht möglich, Pararousch-

brandbazillen mit Hilfe der Agglutination zu differenzieren, da die Pararauschbrandbazillen sowohl von Pararauschbrand- als auch von Rauschbrandserum agglutiniert werden.

In Zusammenfassung der von uns erhobenen Untersuchungsbefunde stellen wir fest:

1) Zur Erzielung einwandfreier Ergebnisse bei vergleichenden Untersuchungen ist sorgfältige Herstellung der Nährböden, gleichmäßige Art der Beimpfung und Schaffung optimaler anaërober Wachstumsbedingungen erforderlich. — 2) Die Evakuierung mit der elektrischen Vakuumpumpe unter Anwendung von Natriumhydrosulfit + Kalilauge hat sich bei der Anaërobenzüchtung sehr gut bewährt. — 3) Die Traubenzuckerblutagarplatte nach Zeissler ist zur Gewinnung von Reinkulturen unentbehrlich und leistet bei der Differenzierung der Anaërobier hervorragende Dienste. — 4) Zur Differenzierung der anaëroben Sporenbildner, insbesondere von Rauschbrand- und Pararauschbrandbazillen geben folgende Nährmedien charakteristische Unterscheidungsmerkmale und eignen sich zur Anaërobenreihe:

1. Traubenzuckerblutagarplatte.
2. Hirnbrei.
3. Steriles hocherstarrtes Rinderserum.
4. Tarozzimilch.
5. Schüttelkulturen, a) gewöhnlicher Agar, b) Traubenzuckeragar.

5) Die serologischen Methoden (Agglutination und Präzipitation) sind für die Differenzierung von Rauschbrand und Pararauschbrand nur teilweise brauchbar.

Literatur.

- 1) Zeissler, J., Die Technik der Anaërobenzüchtung. (Kraus u. Uhlenhuth. Handb. d. mikrobiol. Technik. Bd. 2). — 2) Kollath, W., Vereinfachte Methode für Anaërobenzüchtung. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 95. S. 181). — 3) Zeller, H., Untersuchungen über Rauschbrand. (Sonderabdr. a. „Arbeit. a. d. Reichsgesundheitsamt“). — 4) Seelemann, M., Zur bakt. Diagnose der Gasödeme bei Rind u. Schaf. (Ztschr. f. wiss. u. prakt. Tierheilk. Bd. 52. 1925. H. 6. — 5) Manninger, R., Beitrag zur Aetiologie und Prophylaxe des Rauschbrandes und des malignen Oedems der Wiederkäuer. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 92. 1924. S. 418. — 6) Rottgardt, A., Die Milch nach Tarozzi als Nährmedium und zur Differenzierung des Rauschbrand- vom Pararauschbrandbazillus. (Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 31. 1926). — 7) Kovács, M., Untersuchungen über die Technik der Anaërobenzüchtung. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 95. S. 344). — 8) Sobernheim, G., Ueber Rauschbrand- und Oedembazillen. (Berlin. klin. Wochenschr. 58. 1921. Nr. 26). — 9) Uchimura, Y., Experimentelle Untersuchungen zur Biologie des Rauschbrandbazillus. (Ztschr. f. Hyg. Bd. 92. 1921. S. 291). — 10) Kitt, Th., Neues über Rauschbrand. (Monatsschr. f. prakt. Tierheilk. Bd. 13. 1902. — 11) Mießner u. Meyn, Vergleichende Untersuchungen über den Rinder- und Schafrauschbrand. (Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 1926. Nr. 32. — 12) Wagner, Die Diagnose des Rauschbrandes. (Arch. f. Tierheilk. Bd. 52. 1925).

Nachdruck verboten.

Zur Frage der Pathogenität des *Bacillus suispestifer*. [Aus dem Hygienischen Institut der Albertus-Universität in Königsberg i. Pr. (Direktor: Prof. Dr. Bürgers).]

Von Dr. **Franz Schmidt**, Assistent am Institut.

Die allgemeine Ansicht geht dahin, daß dem *Bac. suispestifer* für den Menschen eine Pathogenität nicht zukommt. Da nach den Untersuchungen Uhlenhuths ein großer Teil aller Schweine *Suispestifer*-Bazillen beherbergt, sind in der Tat tausend und abertausende von *Suispestifer*-Trägern geschlachtet worden, ohne Veranlassung zu einer Infektion gegeben zu haben. In seinem Referat auf dem Mikrobiologenkongreß zu Frankfurt a. M. 1925 geht Uhlenhuth so weit, im Interesse der Vermeidung wirtschaftlicher Schäden die Diagnose des *Bac. suispestifer* zu fordern, da infolge Verwechslung des *Suispestifer* mit *Bac. paratyphi* B „wahrscheinlich vielfach ganz unnötig geschlachtete Tiere dem Handel entzogen“ werden.

Allerdings liegen einige, wenn auch spärliche Beobachtungen vor, die angesichts der bakteriologischen und serologischen Identität der *Suispestifer*-Bazillen aus Schweinen und Menschen die Möglichkeit einer Uebertragung von Tier auf Mensch ernstlich zu erwägen geeignet sind. In seinem Referat hat bereits Uhlenhuth unter kritischer Beleuchtung auf die alten Fälle hingewiesen. In jüngster Zeit mehren sich die Befunde, die mit der Ansicht von der Apathogenität des *Bac. suispestifer* nicht mehr in Einklang zu bringen sind. So berichtet Demnitz über eine Fleischvergiftungsepidemie, bei der nach dem Genuß von Rollschinken 25 Personen erkrankten. Aus dem Schinken konnten reichlich *Suispestifer*-Bazillen herausgezüchtet werden. Obwohl die Bazillen im Stuhl nicht gefunden wurden, macht das Auftreten von Agglutininen, die im Serum der Kranken für die *Suispestifer*-Gruppe spezifisch sind, den Zusammenhang zwischen Schinkengenuß und Erkrankung sehr wahrscheinlich.

Einen ähnlichen Fall berichtet Grüttner. Nach dem Genuß von rohem Schweinehackfleisch und Würsten, worin *Suispestifer*-Bazillen gefunden wurden, erkrankten in Schnarsleben 94 Personen mit Fieber, Durchfall und Erbrechen. Die Verarbeitung eines verendeten Schweines konnte nachgewiesen werden. Ob in diesem Falle dem *Suispestifer* ätiologische Bedeutung zukommt, muß bei dem negativen Bazillenbefund im Stuhl und Blut der erkrankten Personen dahingestellt bleiben.

Nach Mitteilung von Kopp erkrankte ein 16jähriger junger Mensch, aus dessen Blut als Erreger der *Bac. suispestifer* in Galle gezüchtet wurde, an typhusähnlichen Erscheinungen. Die primäre Ursache dieses Falles blieb ungeklärt. Ein Zusammenhang mit dem Genuß vom Fleisch eines kranken Tieres ließ sich nicht nachweisen.

Auch in der ausländischen Literatur finden sich in neuester Zeit Fälle von *Suispestifer*-Infektionen beim Menschen. Nach der Angabe von Monaghan erkrankten 6 Geschwister unter dem Genuß von Büchsenfleisch mit Erbrechen, Krämpfen, Durchfall, Fieber und Niedergeschlagenheit. Sowohl in dem Fleisch als auch in den Stühlen der Erkrankten ließen sich *Suispestifer*-Bazillen nachweisen, während das Blutserum den *Suispestifer*-Stamm agglutinierte. Scott macht Angaben über 4 Fleischvergiftungsepidemien aus verschiedenen Teilen Englands mit im ganzen 100 Erkrankungen und 1 Todesfall. Erreger war überall ein Angehöriger der *Suispestifer*-Gruppe.

Nach Stewart und Litterer zeigten in den Vereinigten Staaten nach Genuß roher Milch mehr als 115 Personen, meist unter 10 Jahren, plötzlich schwere gastro-intestinale Erscheinungen, als deren Ursache die bakteriologische Untersuchung *Suispestifer*-Bazillen ergab.

Zu Beginn des Jahres 1928 hatten wir Gelegenheit, eine Anzahl von Fleischvergiftungsfällen zu untersuchen. Es erkrankten in Königsberg und im Kreise Heiligenbeil nach Genuß von Mettwurst insgesamt 36 Personen.

Die Ermittlungen ergaben, daß der Fleischer K. aus S., der vor dem Ausbruch der Vergiftung im Gefängnis war und im Monat Januar Urlaub er-

hielt, ein Schwein notgeschlachtet hatte, welches er, da offenbar nicht einwandfrei, der Fleischschau und der Untersuchung durch den zuständigen Tierarzt zu entziehen wußte. Dieses Fleisch wurde zu Wurst (Mettwurst) verarbeitet, die der betreffende Fleischer restlos, angeblich für Gefälligkeiten, an Personen in S. und K. verschenkt hat.

Die amtliche Besichtigung ergab, daß ein Arbeitsraum vollkommen fehlte, die Verarbeitung des Fleisches erfolgte in dem einzig vorhandenen Wohn- und Schlafrum. Das Gebrauchswasser wurde in der fraglichen Zeit nicht dem Brunnen des Schlächtereigrundstückes, sondern einem nahen Teich entnommen. Bei der Nachfrage nach etwaigen in der Familie des Fleischermeisters vorhergegangenen Erkrankungen ergab sich außer einer geringen Erkältung eines Familienmitgliedes nichts Auffallendes, und es sind keine Tatsachen bekannt geworden, die mit der Fleischvergiftungsepidemie in Zusammenhang stehen.

Sämtliche 36 Personen erkrankten am 5. 2., 10—12, einige erst 18 Std. nach dem Genuß der erwähnten Mettwürste. Die klinischen Erscheinungen sind bei allen Patienten nahezu die gleichen: akut einsetzendes Erbrechen und starke Durchfälle. Gleichzeitig mit diesen Symptomen stellten sich heftige, von einer Frau als wehenartig bezeichnete Leibschmerzen ein. Der Stuhl war übelriechend, erbssuppenartig und enthielt teilweise etwas Schleim; jedoch in keinem Falle Blut. Die meisten Kranken hatten starke Kopfschmerzen und zeigten hohes Fieber bis 39,5°. Roseolen oder Milzschwellungen waren nicht vorhanden. Trotz stark bedrohlicher Symptome bei dem größten Teil der Erkrankten ist ein Todesfall nicht vorgekommen. Nach 4—6 Tagen waren die Kranken wiederum gesund.

Unmittelbar nach dem Bekanntwerden der ersten Erkrankungen wurden dem Medizinaluntersuchungsamt eine Reihe von Stühlen der erkrankten Personen sowie Reste der genossenen Wurst zugewiesen. Die kulturelle Untersuchung ergab 11mal aus den Stühlen der Erkrankten und 5mal aus verschiedenen von derselben Quelle stammenden Würsten auf Endo-Agar nahezu eine Reinkultur von leicht milchig getrübten, in der Farbe des Nährbodens wachsenden Kolonien. Einmal konnten die Bazillen auch aus dem Urin gezüchtet werden. Auf Malachitgrünagar zeigten die Bakterien üppiges Wachstum. Milchzucker wurde nicht vergoren. Nach 24stünd. Aufenthalt bei 37° C war der Neutralrottraubenzuckeragar zwar wenig, aber immerhin deutlich gespalten und zeigte starke Fluoreszenz. Die Beweglichkeit war sehr gut, so daß auf Grund der kulturellen Prüfung die Zugehörigkeit vorliegenden Bakteriums zur Paratyphusgruppe gegeben war. Die daraufhin vorgenommene Agglutination des isolierten Stammes mit unseren hochwertigen Enteritidis-Gärtner- und Paratyphus B-Seren verlief ergebnislos, zeigte aber geringe Mitagglutinine für Flügge-Breslauserum (Titer 1:6000). Als wir die Agglutination mit zwei verschiedenen Suipestifer-Seren (Reichsgesundheitsamt: Stamm Kunzendorf mit Titer 1:3000 und Behringwerke Marburg mit Titer 1:10000) sowie mit einem Voldagsen-Serum (Reichsgesundheitsamt Op. 829) vornahmen, wurden sämtliche Stämme durch das Suipestifer-Serum bis zum Endtiter, mit Voldagsen-Serum dagegen nur bis zum halben Endtiter agglutiniert.

Die sowohl mit der infizierten Wurst als auch mit den aus den Stühlen isolierten Stämmen gefütterten Mäuse gingen nach 24—72 Std. ein. Aus Herz, Leber und Milz konnten stets Reinkulturen der beschriebenen Bazillen gezüchtet werden. Die Stämme zeichneten sich weiter aus durch Fehlen der Wall- und Knöpfchenbildung (Raffinoseagar), durch Ausbleiben des Rutsch-

phänomens auf Gelatine und durch Gelbfärbung der Rhamnose. Die Glycerin-Fuchsinbouillon nach Stern wurde unter leichter Rötung milchig getrübt.

Des weiteren wurde auch das Castellanische Absättigungsverfahren zur Identifizierung der Stämme und Analyse ihres Rezeptorenbaues herangezogen. Bei der Absättigung unserer Stämme in Suipestifer-Serum verschwanden sämtliche Agglutinine, während bei der Absättigung in Voldagsen-Serum letzteres nicht restlos erschöpft wurde, sondern bei der Nachagglutination mit einem Voldagsen-Stamm noch in einer Verdünnung 1:200 geringe Ausflockung bewirkte. Bei der Absättigung eines Breslausersums mit unseren Stämmen blieben die für diese Fleischvergifter charakteristischen Rezeptoren erhalten.

Ferner wurde die Serumbouillonkultur nach Uhlenhuth, d. h. die Züchtung der Bakterien in einer mit 1proz. Immunsrum versetzten Bouillon, vorgenommen zwecks Feststellung, ob die eingepflichten Bakterien nach 24stünd. Aufenthalt im Brutschrank den Nährboden diffus trüben oder infolge Agglutination unter Wachstum am Boden klar lassen. Das Ergebnis finden wir in nachstehender Tabelle.

Tabelle.

	Bouillon mit 1% Immunsrum von					
	Para-typhus A	Para-typhus B	Enteritidis-Gärtner	Flügge-Breslau	Suipestifer (Kunzendorf)	Voldagsen
Der fragliche Stamm	—	—	—	—	+	±
Suipestiferstamm	—	—	—	—	+	+
Flügge-Breslaustamm	—	—	—	+	—	—

— Bouillon diffus getrübt; + 3 Bouillon klar, Bakterienwachstum nur am Boden; ± geringer Bodensatz, geringe diffuse Trübung.

Unsere Stämme — es wurden mehrere sowohl von den aus Stühlen der Erkrankten wie auch aus den Würsten gezüchteten geprüft — lassen, wie die Suipestifer-Stämme, nur die mit Suipestifer-Serum versetzte Bouillon klar, die Voldagsen-Serumkultur zeigte geringes Bodenwachstum mit genügender diffuser Trübung. In allen übrigen Kulturen weisen die Bazillen diffuses Wachstum auf. Bei dem Suipestifer-Laboratoriumsstamm waren quantitative Unterschiede in der Suipestifer- und Voldagsen-Serumkultur nicht feststellbar. Interessant ist besonders die Tatsache, daß in Bestätigung und Erweiterung der Beobachtungen Uhlenhuths auch frisch gezüchtete Stämme sich hierbei verhalten wie alte Laboratoriumskulturen.

Nur in einer Hinsicht zeigten sämtliche Stämme ein atypisches Bild, in dem die in den ersten Tagen der Beimpfung mit Suipestifer-Bouillon gerötete Lackmusmolke auch nach Wochen kein Anzeichen eines Umschlages ins Blaue erkennen ließ.

Die Gruber-Widalsche Reaktion des Patientensersums mit Suipestifer-Bouillon war in zwei Fällen in einer Verdünnung 1:200, in drei Fällen in einer Verdünnung 1:100 positiv. Alle übrigen Seren enthielten keine Agglutinine für den Bac. suipestifer. Ob im Verlaufe der Erkrankung der Widal anstieg, konnte leider nicht beobachtet werden, da die Patienten infolge schnellen Abklingens der klinischen Symptome sich der weiteren Behandlung entzogen.

Nicht unerwähnt lassen möchte ich, daß durch Vermittlung des zuständigen Tierarztes von sämtlichen Tieren des Schweinebestandes, aus dem das notgeschlachtete Tier stammte, Kot eingesandt wurde. Suipestifer-Bazillen waren in dem Kot nicht nachweisbar.

Es handelt sich demnach bei dieser Königsberger Epidemie um eine Infektion mit Suipestifer-Bazillen, die sich durch eine starke Virulenz¹⁾ auszeichnet. 100 Proz. aller Personen, die von der Mettwurst gegessen haben, sind 10—18 Std. nach dem Genuß schwer erkrankt, dabei haben sie meistens nur geringe Mengen, in mehreren Fällen nur je eine dünne Scheibe von der Mettwurst genossen.

Angesichts dieser sowie der anderen Orts erhobenen Befunde erhebt sich die Frage, ob die von vielen Autoren vertretene Anschauung von der Apathogenität der Suipestifer-Bazillen sich noch vertreten läßt. Gewiß muß zugegeben werden, daß im allgemeinen der Bac. suipestifer für den Menschen ein harmloser Mikroorganismus ist, da sonst bei den vielen Menschen, die mit der Wartung und Pflege der Schweine beschäftigt sind, Epidemien an der Tagesordnung sein müßten; doch läßt sich die Tatsache nicht leugnen, daß der Bac. suipestifer gelegentlich aus unbekannter Ursache seine saprophytäre Natur ändern und zu menschlichen Erkrankungen führen kann.

Zusammenfassung.

Nach Genuß von Mettwurst erkrankten in Königsberg und im Kreise Heiligenbeil 36 Personen an akut toxischen Erscheinungen. 5mal aus Mettwurst, 11mal aus Stühlen und 1mal aus Urin konnten Bazillen gefunden werden, die sowohl kulturell (mit Ausnahme der Lackmusmolke) wie serologisch sich als Suipestifer-Bazillen erwiesen und sich durch eine starke Virulenz auszeichnen. 100 Proz. aller Personen, die von der Wurst genossen hatten, sind erkrankt. Trotz anfänglich bedrohlicher Symptome sind sämtliche Erkrankungen in schnelle Genesung übergegangen. Die Epidemie zeigt, daß das Bact. suipestifer gelegentlich entgegen der allgemeinen Ansicht von seiner Apathogenität zu menschlichen Erkrankungen führen kann.

Literatur.

Uhlenhuth, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 97. S. 219. — Schnitter, Münch. med. Wochenschr. 1927. S. 1011. — Grüttner, Inst. f. Fleischhyg. Jahrg. 3. 1927. S. 327. — Demnitz, Dtsch. tierärztl. Wochenschr. 1926. S. 345. — Kopp, Dtsch. med. Wochenschr. 1926. S. 2156. — Monaghan, Ref. J. Americ. med. Assoc. Vol. 67. 1925. p. 407. — Stewart u. Litterer, Journ. of Americ. med. Assoc. Vol. 89. p. 1584.

1) Ueber die Giftbildung der Stämme wird in einer besonderen Mitteilung berichtet werden.

Nachdruck verboten.

Untersuchungen über den *Bacillus pyogenes* und den Pfeilerschen „*Bazillus der bösartigen Euter-entzündung*“.

[Aus der Lehrkanzel für Buiatrik (und klinische Seuchenlehre) der Tierärztlichen Hochschule in Wien (Vorstand: Prof. Dr. L. Reisinger).]

Von Dr. **Karl Diernhofer**, Assistent der Lehrkanzel.

Mit 5 Abbildungen im Text.

Eingegangen bei der Redaktion am 4. Februar 1928.

Die Pyobazilliose des Euters, die zuerst von Künnemann, Poels, Glage und anderen beschrieben und von Holth, Vielhauer und von Heyck eingehend untersucht wurde, ist eine durch den *Bacillus pyogenes bovis* unterhaltene, chronische, purulente, indurative und abszedierende Mastitis. Sie scheint bei uns, wo sie zu den häufigsten und wegen ihrer Unheilbarkeit unangenehmsten Mastitisformen gehört, nur im Anschluß an eine akute Mastitis anderer Aetiologie auftreten zu können. Wenigstens haben wir bei allen derartigen Erkrankungen, wenn sie nicht schon sehr veraltet waren, immer Streptokokken, Staphylokokken oder Bakterien aus der Coli-Aerogenes-Gruppe als vermutlich primäre Ursache nachweisen können, in geeigneten Fällen konnten wir akute Mastitiden von Anfang an verfolgen, bei denen sich zu einem gewissen Zeitpunkte Pyogenes-Bazillen zu den ursprünglichen Erregern der erwähnten Arten gesellten, während diese allmählich völlig verschwanden.

In Schleswig-Holstein, Holland und Dänemark herrscht aber eine seuchenartig unter dem Weidevieh auftretende, sehr bösartige, akute Euterkrankheit, deren alleiniger und primärer Erreger der *Bac. pyogenes* sein soll. Diese „Schleswig-Holsteinsche Weideseuche“, „Euterseuche“ oder „Yüddersük“ ist meines Wissens zuerst von Nielsen (1908) als selbständige Krankheit beschrieben worden. Die Erkrankung beginnt mit hohem Fieber, Schwellung der Zitzen und des ganzen befallenen Viertels. Das Sekret ist wässrig, graugelb oder dick und blutig, immer übelriechend. Sehr häufig kompliziert sich die Mastitis mit Polyarthrit, Nephritis, Pneumonie oder mit Abortus mit oft tödlicher Endometritis. Nielsen selbst vermutet eine Mischinfektion von Pyogenes-Bazillen mit anderen Mastitisserregern als Krankheitsursache. Bei einer Erkrankung, deren Symptome mit den von Nielsen beschriebenen gut übereinstimmen, wurde durch v. Ostertag und Weichel „der *Bac. pyogenes* als Ursache festgestellt“. Poels beschreibt anscheinend dieselbe Krankheit unter dem Namen „Wrang“ und nennt als Erreger den *Bac. pyogenes*. In neuerer Zeit fanden Klimmer, Haupt und Glöckner bei einer enzootischen Mastitis den *Bac. pyogenes* und Seelemann teilt mit, daß er ihn aus kranken Eutern von Rindern, die aus Dänemark eingeführt waren, wiederholt züchten konnte.

War die Verwunderung über diese uns ungewohnte Wirkungsweise des *Bac. pyogenes* durch den Gedanken leicht zu beschwichtigen gewesen, daß eben in Norddeutschland virulenter Stämme vorkommen könnten, so tauchten wirkliche Zweifel an seiner ätiologischen Bedeutung für die Yüddersük auf, als Pfeiler im Jahre 1925 einen aus frischem Materiale isolierten neuen Bazillus als Erreger dieser Seuche bezeichnete, der, obgleich mit dem *Bac. pyogenes* nicht identisch, diesem nach des Entdeckers eigener Angabe morphologisch so ähnlich ist, daß bei den in den Laboratorien üblichen diagnostischen Methoden eine Verwechslung der beiden Arten leicht denkbar wäre. Tatsächlich sind einige der früher erwähnten Feststellungen in so lapidarem Stil verfaßt, daß man daraus nicht ersehen kann, welche Kriterien zur einwandfreien Erkennung des „*Bac. pyogenes*“ herangezogen wurden; andererseits ist in Fällen, in denen der letztere zweifellos vorgelegen hat, die Materialentnahme längere Zeit — oft mehrere Wochen — nach Beginn der Erkrankung erfolgt, wo ja erfahrungsgemäß eventuell vorhandene primäre Krankheitserreger längst verschwunden sein können. Der Pyobazillus könnte sich also bei der Yüddersük ähnlich verhalten wie bei der „Schweineseuche“, als deren Erreger er eine

Zeitlang angesehen wurde (Grips, Glage, Nieberle), bis man erkannte, daß er nur bei bereits vorhandener Schwächung der Tiere durch andere Ursachen eine — dann allerdings wohl ausgeprägte, selbständige — Erkrankung, die „pyämische Kachexie“, hervorrufen könne (Ostertag, Olt, Stadie, Gerhard, Putz). Interessant ist es auch, daß Thomas den *Pyogenes*-Bazillus nur bei älteren Metritiden des Rindes fand, während bei jüngeren vorwiegend Kokken zu finden waren. Bei eitrigen Bronchopneumonien des Rindes spielt der *Bac. pyogenes* nach Holth und Reisinger immer eine sekundäre Rolle. Poels konnte die Polyarthritiden der Kälber nur durch Injektion von Mischkulturen des *Bac. pyogenes* mit *Bact. coli*, nicht aber mit *Pyogenes*-Reinkultur künstlich erzeugen. Ein noch näherliegendes Analogon zu den supponierten Verhältnissen bei der Yüddersük hätten wir im „Mal de Lure“ (Carré, Galli-Valerio), wo der *Pyobazillus* im Anschluß an die kontagiöse Agalaktie der Schafe und Ziegen eine besondere Pyämie unterhält.

Die ganze Frage hat für uns deshalb eine so große Bedeutung, weil sowohl Pfeiler als auch die Autoren, die den *Bac. pyogenes* als Erreger der Yüddersük bezeichnen, einer Immunisierung mit spezifischen, aus ihren Bakterien hergestellten Impfstoffen gute Schutz- oder gar Heilerfolge zuschreiben.

Wir hatten uns der *Pyogenes*-Mastitis gegenüber immer machtlos gefühlt. Dann, als wir — durch die ersten Mitteilungen über die Euterseuche ermutigt — glaubten, durch Impfung wenigstens bei gewöhnlicher Mastitis die Ausschaltung der Komplikationen mit dem *Bac. pyogenes* versuchen zu können, erschütterten die Pfeilerschen Mitteilungen diese Hoffnung, die allerdings nur auf einigen in der Literatur niedergelegten, für einen unumstößlichen Beweis zu wenig zahlreichen Experimenten und auf mehreren Berichten und Statistiken über meist unkontrolliertes Drauflosimpfen aufgebaut war. Auch die von Berger beobachtete Vermehrung der Agglutinine nach subkutaner Vorbehandlung von Kaninchen beweist hier nichts, da die Bildung von Agglutininen im allgemeinen nicht unbedingt mit der gleichzeitigen Erlangung einer Immunität verbunden ist (Rotz, Abortus Bang) und im besonderen sogar die Serumtiere Bergers selbst nie richtig immun wurden, da sie auch bei den letzten Antigeninjektionen die typischen *Pyogenes*-Abszesse bekamen.

Allerdings war die selbständige Stellung des Pfeilerschen Bazillus gegenüber dem *Bac. pyogenes* anfangs nicht ganz klar und blieb auch nicht unangezweifelt. Es hätte sich auch hier vielleicht nur um eine besonders virulente und auch sonst etwas stärker abweichende Varietät des *Bac. pyogenes* handeln können und die ausgezeichneten Impferfolge, über die Pfeiler und Schlaak berichten, wären zu den vorerwähnten anderen als Bekräftigung hinzugekommen.

Um hier Klarheit zu bekommen, begann ich in diesem Frühjahr, vergleichende Untersuchungen von norddeutschen, bei der Weideseuche gefundenen *Pyogenes*-Stämmen mit einheimischen einerseits, mit dem Pfeilerschen Mastitisbazillus andererseits anzustellen, wobei ich auch besonderen Wert darauf legte, einfache, auch in einem rein diagnostischen Laboratorium leicht darzustellende Unterscheidungsmerkmale zu finden.

Später machte Pfeiler auf die Ähnlichkeit seines Bazillus mit dem Erreger der Pyelonephritis des Rindes — wiederum einer Erkrankung, der wir in der Praxis machtlos gegenüberstehen — aufmerksam. Ich bezog daher auch 4 *Bovis-renal*-Stämme, die ich teils aus dem Harn lebender, teils aus den Nieren geschlachteter Patienten herausgezüchtet hatte, in meine Versuche ein. Da sich aber dabei der Pfeilersche Bazillus von den Pyelonephritisstämmen deutlich verschieden zeigte und derzeit keine Zweifel an der Artverschiedenheit mehr bestehen¹⁾, erübrigt sich hier ein weiteres Eingehen auf die dabei beobachteten Einzelheiten.

Hingegen möchte ich die ersterwähnten Versuche genauer behandeln, nicht nur, weil durch sie die inzwischen erschienenen Beobachtungen Pfeilers und Seelemanns über den Yüddersükbazillus teils bestätigt, teils vervollständigt werden, sondern auch weil unsere Kenntnisse über den *Bac. pyogenes* dabei manche Erweiterung und auch Richtigestellung erhalten haben.

1) Herr Prof. Pfeiler, dem ich Reinkulturen meiner Stämme übersandte, teilte mir gleich nach Erhalt derselben mit, daß er den Yüddersükbazillus für nicht identisch mit ihnen ansehe.

Eigene Untersuchungen.

Von den untersuchten 6 heimischen *Pyogenes*-Stämmen hatte ich 2 aus chron. erkrankten Eutern, 1 aus einem Lungenherd gezüchtet, 1, der bei einer Kuh Abortus ohne andere Krankheitserscheinungen verursacht hatte, war in Reinkultur in Unmengen auf den Kotyledonen und im Labmagen des Foetus gefunden worden; ein weiterer stammt aus einem Abszeß einer Ziege und der 6. aus einem Abszeß eines Schweines. 2 *Pyogenes*-Stämme, welche aus 2 aus dem Hamburger Schlachthof kommenden Eutern von Kühen mit „holsteinischer Euterseuche“ gezüchtet worden waren, verdanke ich der Güte des Herrn Professor M. Klimmer in Leipzig, während mir den „Yüddersükbazillus“ Herr Professor W. Pfeiler in Jena zur Verfügung stellte. Es sei mir gestattet, den beiden Herren auch an dieser Stelle für die liebenswürdige Ueberlassung ihrer Stämme meinen ergebensten Dank auszusprechen.

Die *Pyogenes*-Stämme waren vor Beginn der Untersuchungen verschieden lange Zeit (4 Monate bis 1 Woche) auf künstlichen Nährböden fortgezüchtet worden. Unterschiede zwischen diesen Stämmen waren nicht zu bemerken. Weder das Alter eines Stammes, noch Tierart, Organ oder geographischer Ort seiner Herkunft hatten einen dauernden Einfluß auf sein morphologisches oder kulturelles Verhalten.

Färbbarkeit und mikroskopisches Aussehen.

Die Färbung gelingt sowohl beim *Pyogenes*-Bazillus als auch beim Yüddersükbazillus mit den gebräuchlichen Anilinfarben, besonders gut mit verdünntem Karbolfuchsin. Sehr schöne, klare Bilder liefert auch die Färbung nach Giemsa. Beide Arten sind grampositiv. Für den Yüddersükbazillus gilt dies fast ohne Einschränkung, wie er überhaupt besser und gleichmäßiger färbbar zu sein scheint. Der Pyobazillus nimmt jedoch leicht, besonders wenn die Jodlösung nur kurze Zeit einwirkt und wenn zu lange und mit zu konzentrierter Fuchsin- oder gar Karbolfuchsinlösung nachgefärbt wird, die Kontrastfarbe an, ja, in älteren Bouillonkulturen ist er bei gewöhnlicher Gram-Färbung sogar fast immer gramnegativ, oder die Bakterien erscheinen teils blau, teils in der Gegenfarbe. Dagegen gelingt die Darstellung in dunkelblauer Farbe auch in solchen Kulturen und in Organausstrichen (Eutersekret) immer schön und deutlich nach folgender Methode, welche in der Hauptsache von Jensen angegeben wurde: 1) Fixation durch Hitze; 2) Färben mit einer 0,5proz. Lösung von Methylviolet 6 B in dest. Wasser durch 1 Min.; 3) Abspülen mit Lugol'scher Lösung (1,0 : 2,0 : 100,0) und Auftragen frischer Lugol-Lösung, welche dann 2 Min. wirken soll; 4) Entfärben mit Alkohol, bis nur mehr die dicksten Stellen des Ausstriches blau, die dünneren aber vollständig farblos erscheinen. (Die *Pyogenes*-Bazillen entfärben sich dabei auch bei sehr energischer Alkoholbehandlung nicht); 5) Wasserspülung; 6) Nachfärben mit einer Lösung von Neutralrot 1,0 und Eisessig 2,0 auf Wasser 1000,0 durch 5 Min.; 7) Wasserspülung; 8) Nun färbe ich noch mit einer dünnen Fuchsinlösung (3 Tropfen der alkoh. Stammlösung auf 15 ccm Wasser) ganz kurze Zeit nach ($\frac{1}{2}$ Min.!); 9) Wasserspülung. *Pyogenes*-Bazillen und andere grampositive Bakterien erscheinen tiefschwarzblau, Zellkerne und gramnegative Bakterien lebhaft ziegelrot (durch Neutralrot) Zelleiber, Eiweißgerinnsel hellrosa (Fuchsin)¹⁾. Häufig findet man die *Pyogenes*-Bazillen unterbrochen gefärbt. Brown und Orcutt bezeichnen diese Form als „Streptokokkenform“ des *Pyogenes*-Bazillus. Die Gebilde sehen tatsächlich Streptokokken sehr ähnlich, nur sind

1) Diese Färbungsmethode eignet sich auch vortrefflich für die Untersuchung von Eutersekret auf Streptokokkenmastitis.

die einzelnen Körner unregelmäßig eckig geformt und ungleich groß, im allgemeinen sehr klein. Nach Brown und Orcutt läßt sich die Stäbchenform auch hier dadurch erweisen, daß man im Mikrophotogramm die für das Auge selbst unsichtbare, ungefärbte Zwischensubstanz zwischen den einzelnen Körnern sichtbar macht. Ich habe aber in Tuschepräparaten nach Burri aus solchen „streptokokkenförmigen“ Kulturen immer ganz dieselben unterbrochenen, gekörnten Formen gesehen wie im gefärbten Präparat, so daß ich den Eindruck hatte, die ganzen Gebilde bestünden nur aus den färbbaren Körnern.

Sonst ist die Form sowohl des *Pyogenes*-Bazillus wie auch die des *Yüddersükbazillus* meist die eines schlanken, „rotlaufähnlichen“ Stäbchens von 2—3 μ Länge und 0,2—0,3 μ Dicke. Es scheint, daß der letztere häufig etwas länger, eleganter sei und seine Form einheitlicher beibehalte als der *Pyobazillus*, der sich je nach dem Nährboden und dem Alter der Kultur öfter als der andere als keulenförmiges, gebogenes Stäbchen zeigt oder die erwähnte *Streptokokkenform* annimmt.

Die von Brown und Orcutt beschriebene „Spindelform“

hatte der *Pyobazillus* immer, wenn er eben frisch aus Uterussekret stammte (auch bei 2 intravenös — einmal mit einem Klimmerschen Stamm — infizierten, trächtigen Kühen, die dann abortierten): Ein ovales oder punktförmiges, stark grampositives Korn liegt in einem länglichen, in der Kontrastfärbung erscheinenden „Zelleib“ der meist nach einer Seite in einen spitzen, allmählich ganz verblassenden, oft leicht gebogenen „Schweif“ ausläuft (Fig. 1). Die Keulenform und noch mehr die für den *Pyogenes*-Bazillus so charakteristische Parallellagerung und Häufchenbildung wird auch

beim Pfeilerschen Bazillus recht häufig beobachtet. Einen großen Einfluß auf die Bakterienform scheint die Wasserstoffionenkonzentration auszuüben. Darauf soll weiter unten näher eingegangen werden.

Das wichtigste morphologische Merkmal des „Yüddersükbazillus“, das ihn besonders vom *Pyobazillus* unterscheidet, ist seine Begeißelung. Seelemann hat als erster auf die inzwischen von Pfeiler bestätigte Beweglichkeit des Mastitisbazillus in ganz jungen Kulturen hingewiesen, ohne jedoch Geißeln einwandfrei darstellen zu können. Ich verwendete als Untersuchungsmaterial Oberflächenkulturen von Serum-Agar-Gelatineplatten und als Aufschwemmungsflüssigkeit sterilisiertes, zimmerwarmes Leitungswasser. Bewegung vom Ort war im hängenden Tropfen bei Verwendung von ganz jungen, fast ebensogut aber auch bei älteren (36 Std. alten) Kulturen zu sehen. Die Bewegung ist ganz eigenartig: Während größere zusammenhängende Bakterienhaufen ganz ruhig liegen und einige Individuen eine zitternde Bewegung ausführen, die wohl als Brownsche Molekularbewegung aufzufassen ist, tanzen andere mit bohrender



Fig. 1. Sogenannte „Spindelform“ des *Bacillus pyogenes*. (Aus dem Labmageninhalt eines abortierten Fötus). Gram-Färbung, Vergr. 1:1000.

kreisender Bewegung um einen unsichtbaren fixen Punkt, ohne eigentlich fortzukommen. Dieser Anblick erinnert an die Erscheinung bei Spermauntersuchungen, wenn der Schweif mancher Spermien mit dem Ende scheinbar irgendwo festklebt und der Kopf sich in lebhafter Hin- und Herbewegung abmüht. Bei den Bazillen macht es auch den Eindruck, als seien die Geißeln irgendwie verfilzt, zumal solche Individuen meist ganz in der Nähe größerer Häufchen liegen. Endlich sieht man Bazillen, die mit mäßiger Lebhaftigkeit durchs Gesichtsfeld zappeln.

Das Zettnow-Präparat aus derselben Kolonie läßt so gut wie alle Individuen begeißelt erscheinen. Viele Stäbchen tragen eine lange, gewellte Geißel, die an einem Pol oder aber auch mitten aus der Längsseite entspringt. Die meisten tragen 2—3 Geißeln; mehr als 6 Geißeln, die an verschiedenen Stellen des Bakterienleibes abgehen, konnte ich an einzeln liegenden Individuen nicht

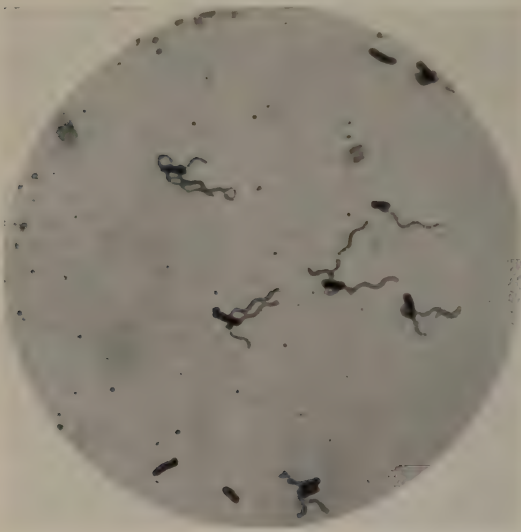


Fig. 2. Nach Zettnow behandeltes Präparat aus einer 24stünd., bei Zimmertemperatur auf Serum-Gelatineagar gewachsenen Kolonie des Pfeilerschen „Bacillus der bösartigen Euterentzündung“. Vergr. 1: 1000.

zählen, doch läßt die unverhältnismäßig große Zahl von Geißeln, die an kleineren, zusammenliegenden Gruppen zu sehen sind, vermuten, daß bei der Lostrennung der einzeln liegenden Bazillen Geißeln zerstört wurden (Fig. 2)¹⁾.

Bei den *Pyogenes*-Stämmen ist es mir auf keine Weise gelungen, Geißeln oder Bewegung vom Ort zu beobachten.

Allgemeine Lebensbedingungen.

Die Züchtung gelingt bei beiden Arten in gewöhnlicher Luft ebensogut wie streng anaërob (Zeissler: Pyrogallolverfahren kombiniert mit Züchtung im luftverdünnten Raum) und andererseits war das Wachstum gleich gut, wenn die mit der Wasserstrahlpumpe aus dem Exsikator entfernte Luft durch reinen

Sauerstoff ersetzt worden war. Ein Unterschied besteht jedoch in der Empfindlichkeit gegen Kohlensäure. Werden in der gleichen Weise wie bei den eben genannten kombinierten Luftverdünnungs-Pyrogallolverfahren statt des Pyrogallols 150 g Natrium bicarbonicum (zur Verhinderung von „Staubbildung“

1) Da die Drucklegung der vorliegenden Arbeit durch äußere Umstände verzögert wurde, ist seither schon eine Mitteilung zu dieser Frage erschienen (Plasaj, Deutsche Tierärztl. Wochenschr. 1928. Heft 11. S. 199), in welcher an der Hand zweier Abbildungen zu zeigen versucht wird, daß der Yüddersükbazillus eine polare Geißel trage. Ich kann dieser Anschauung nicht beipflichten. Ich habe selbst, als ich begann, die Geißeldarstellung beim Yüddersükbazillus zu versuchen, häufig ähnliche Präparate wie Plasaj erhalten, konnte mich aber nicht überzeugen, daß diese ein genügend einwandfreies Bild für eine richtige Beurteilung abgaben. Nach mehreren Versuchen mit kleinen Abänderungen erhielt ich erst etwas klarere Bilder, die freilich für eine systematische Beschreibung noch lange nicht genügen würden. Da es sich aber hier nur um die Arttrennung von *B. pyog.* handelt, überlasse ich die Klärung der Einzelheiten — falls der *Y.*-Bazillus überhaupt so große Bedeutung erlangt — gerne einem auf diesem Gebiete geübten Untersucher.

mit Wasser gerade bedeckt) verwendet, so kann man nach gründlichem Auspumpen des mit den Blutagarkulturen beschickten Exsikkators dadurch, daß man durch eine entsprechende Vorrichtung (statt der Kalilauge) allmählich 250 ccm Acidum hydrochloricum dilutum (12,5 Proz. HCl) einschließen läßt, die restliche stark verdünnte Luft durch die stürmisch freiwerdende Kohlensäure ganz verdrängen und nach richtigem, allmählichem Abstellen der Pumpe den ganzen Innenraum mit Kohlensäure voll bekommen, wobei der unzersetzt verbleibende, große Ueberschuß an Natriumbikarbonat die Bildung freier Salzsäuredämpfe hindern soll. In dieser nahezu reinen Kohlensäureatmosphäre gedeihen die *Pyogenes*-Bazillen ausgezeichnet, während der Pfeilersche Bazillus überhaupt nicht oder — bei einem einzigen Versuch auf einer Platte — ganz spärlich anging. Diese Wachstumshemmung kann nicht durch die Säuerung der Nährböden durch das Kohlendioxyd begründet sein, denn der Yüddersükbazillus gedeiht sonst auch noch auf fast noch etwas sauren Nährböden als der *Pyogenes*-Bazillus. Uebrigens veränderte sich der „Wasserstoffexponent“ einer in offener Petri-Schale zur Kontrolle mit in den Exsikkator gestellten Bouillon, welche durch 0,2proz. Karbolsäurezusatz steril erhalten wurde, in der ganzen Beobachtungszeit von 8 Tagen nur von 8,0 auf 7,0.

Um den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf das Wachstum der beiden Arten zu prüfen, wurden durch Zusatz von Natronlauge oder Salzsäure zu 5proz. Serumbouillon 23 verschiedene Nährflüssigkeiten in der Weise hergestellt, daß der nach der Filtration durch Seitz-Filter und nach Abfüllen in Röhrenserien mit der Komperatormethode nach Michaelis bestimmte „Wasserstoffexponent“ bei der am stärksten sauren Bouillon ($p_H =$) 4,0 betrug und von Reihe zu Reihe um je 0,2 (also bis 8,4) stieg. Außerdem wurden noch 3 stark alkalische Bouillonserien hergestellt, welche durch Zusatz von 10, 20 bzw. 30 ccm Normallauge zu 1 Liter Serumbouillon von einem $p_H = 8,4$ erhalten wurden. Bei einem gewissen Säuregrad ($p_H = 6,2$) trat eine Trübung der Bouillon ein, welche bei einem Wasserstoffexponenten von 4,4—4,0 am stärksten war (jedoch bei weiterem starkem Säurezusatz wieder verschwand). Die anfangs klaren Filtrate der stärker sauren Reihen trübten sich alsbald spontan, erwiesen sich aber als vollkommen steril und die Niederschläge, welche nicht im Serum oder im Pepton, sondern in Bestandteilen des Fleischwassers ihren Ursprung haben, verschwanden bei der Kontrolle auf Zusatz von etwas Kalilauge mit einem Schlage. Als amphotere Flüssigkeiten reagierten meine Bouillonreihen ziemlich unterschiedlich gegen verschiedene der gebräuchlichen Indikatoren: Leicht „alkalische Reaktion“ gegen Phenolphthalein zeigte sich erst bei einem $p_H = 8,0$; bei $p_H = 8,4$ trat erst intensive Rotfärbung ein. Der „Neutralpunkt“ lag für Neutralrot zwischen $p_H = 7,4$ und 7,2, für Rosolsäure ebenso wie für Alizarol zwischen $p_H = 6,8$ und 6,6, für Lackmüslösung zwischen 6,6 und 6,4 und für Methylorange etwa bei $p_H = 4,4$ —3,8.

Nach 3tägigem Aufenthalte im Brutschrank wurden die sterilen Röhren mit je einem Tropfen 48stünd. Serumbouillonkultur der zu untersuchenden Stämme beschickt.

Alle *Pyogenes*-Stämme zeigten folgendes Verhalten: Alle Bouillonröhren, in denen überhaupt Wachstum eintrat, blieben vollkommen klar, es entstand lediglich ein mehr oder weniger reichlicher Bodensatz in der Kuppe, der in den Röhren mit einem Wasserstoffexponenten von 7,4—6,2 schon nach 24 Std. reichlich vorhanden war. Bei stärker alkalischer Reaktion wuchsen die Bazillen etwas langsamer, entwickelten sich aber auch in den am stärksten alkalischen Bouillonproben gut. Bei stärker saurer Reaktion dagegen ($p_H = 5,8$) war das Wachstum bereits merklich eingeschränkt, bei $p_H = 5,6$ war nach 8 Tagen nur wenig und bei $p_H = 5,4$ nur eine Spur Sediment zu sehen.

Der weißlichgelbe Bodensatz hatte in den stärker alkalischen Röhren eine züige Beschaffenheit und bildete beim Umschütteln lange Fäden, ließ sich aber nicht schwer verteilen. Bei stärkerer Säuerung (von $p_H = 6,6$ an) zeigten sich Flöckchen und Bröckeln, die bei $p_H = 6,4-6,0$ am massigsten waren und sich zum Teil schwer zerschütteln ließen (Agglutination). Die Bakterien selbst erschienen bei der Untersuchung am 8. Tage in den mehr alkalischen Proben (etwa bis $p_H = 6,6$) als zarte, lanzett- bis spindelförmige, „streptokokkenartig“ gekörnte Stäbchen, die reinsten schlanken Stäbchen zeigten sich bei $p_H = 6,4$ bis $p_H = 6,2$, bei $p_H = 6,0$ traten gröbere Keulenformen, Kugeln und plumpere Stäbchen auf (die sich bei Ueberimpfung auf Serumagar als *Pyogenes-Bazillen* erwiesen), bei noch stärkeren Säuregraden fanden sich keulige Formen, die wie gequollen und breitgequetscht aussahen und welche sich nicht mehr überimpfen ließen.

Der Pfeilersche Bazillus verhielt sich in 3 Parallelreihen übereinstimmend wie folgt:

Die Serumbouillon wurde anfangs in allen Röhren, in denen überhaupt Wachstum eintrat, gleichmäßig getrübt, später bildete sich ein weißlichgelber Bodensatz und die Flüssigkeit wurde sowohl in den stark „alkalischen Röhren“ (von $p_H = 8,4$ aufwärts) als auch in den stärker sauren (von $p_H = 6,4$ abwärts) beinahe ganz klar, während in den dazwischenliegenden die Bouillon leicht getrübt blieb. Das Wachstum war am besten in den Röhren von $p_H = 8,0$ bis $p_H = 6,0$. Das Sediment war bei alkalischer Reaktion zusammenhängend und bildete beim Umschütteln fädige, zähe Flocken, die sich nicht sehr leicht zerteilen ließen. In den Röhren mit $p_H = 8,0$ waren die Flocken schon mehr schollig, bei $p_H = 7,8$ bestand der Bodensatz aus Schollen und Bröckeln; in stärker sauren Nährmedien (von $p_H = 6,4$ an) war das Sediment sehr fest gelagert und haftete oft so fest am Boden des Röhrens, daß es schwer aufzuwirbeln war, es ließ sich dann aber verhältnismäßig leicht verteilen. Bei einem p_H von $5,2$ abwärts trat kein Wachstum mehr ein. Die Bazillen selbst hatten in den alkalischen Medien oft geradezu das Aussehen unregelmäßiger Diplokokken, nach Giemsa gefärbt zeigten sich schöne rote Stäbchen mit blauen punkt- und strichförmigen Einschlüssen. In den Röhren mit p_H von $6,6-6,0$ erschienen sie als typische „diphtheroide“ Stäbchen, die von *Pyelonephritisbazillen* nicht zu unterscheiden wären. Bei stärker saurer Reaktion wurden sie noch mehr kolbig und keulenförmig, auch ovale, hefepilzähnliche Formen zeigten sich. Bei einem p_H von $5,4$ kamen sogar fast pilzähnliche, scheinbar verzweigte Formen zum Vorschein, die an kurze ungleichmäßige dicke, gebogene Wurzelstücke erinnerten. (Ähnliche Gebilde fand ich einmal auf einer alten Kartoffelkultur des *Yüddersükbazillus*: sie nahmen auch hier bei der Verimpfung auf andere Nährböden sofort wieder ihre gewohnte Gestalt an). Zum Unterschied von den *Pyogenes-Bazillen* wurde der Pfeilersche Bazillus bei seinem 8tägigen Aufenthalte in sauren Nährböden nicht abgetötet. Sogar aus den Röhren „ $p_H = 4,6$ “, wo schon längst keinerlei sichtbares Wachstum mehr stattgefunden hatte, war er noch leicht herauszuzüchten.

Eine bemerkenswerte Säuerung der Nährböden durch die Lebenstätigkeit der Bazillen konnte bei keiner Art festgestellt werden. Der Wasserstoffexponent war innerhalb der Zeit von 8 Tagen nur in einigen Röhren, besonders den stark alkalischen, um etwa $0,2$ kleiner geworden.

Der Einfluß der Temperatur auf das Wachstum konnte nicht genauer geprüft werden. Nur das eine wurde festgestellt, daß der *Yüddersükbazillus* im Gegensatz zum *B. pyogenes*) auch bei einer Zimmertemperatur von $15-18^{\circ}C$ in unverminderter Ueppigkeit gedeiht.

Der *Bac. pyogenes* bedarf nach der übereinstimmenden Meinung der Autoren zu seinem Wachstum auf künstlichen Nährböden der Anwesenheit von Eiweiß. Nur Seelemann berichtet, daß er 10 Stämme durch 20 Generationen nur von Agar zu Agar fortpflanzen konnte. Mir gelang es nicht, meine *Pyogenes*-Stämme auf eiweißfreien, festen Nährböden zur Entwicklung zu bringen, wohl aber war in gewöhnlicher Bouillon immer ein mäßiges Wachstum zu erzielen. Einige Male wuchsen sogar auf Kartoffeln, die allerdings mit einer großen Menge Kultur (ohne Uebertragung von anderem eiweißhaltigem Material) beimpft waren, eine oder zwei recht üppige Kolonien des *Bac. pyogenes*. Ausgezeichnet wächst er in Milch, ferner in erstarrtem Serum, auch dann, wenn es längere Zeit bei 90° C gehalten wurde, so daß es ganz hart und hornartig ist. Für die Züchtung auf Agar kann diesem Blut, Blutserum, Milch, Eiereiweiß oder auch Gelatine zugesetzt werden. Der beste Nährboden für den *Bac. pyogenes* ist Traubenzucker-Rinderblutagar, den ich, wenn es sich nicht um eine exakte Identitätsprüfung, sondern nur um die Gewinnung großer Mengen von Kulturmasse oder um die Prüfung der Lebensfähigkeit einer Kultur oder um den Nachweis weniger Keime in bakterienarmen Material handelt, einfach in folgender Weise herstelle: Eine Injektionsnadel von mittlerer Dicke wird unter sterilen Kautelen in die mit Hilfe einer Aderlaßschnur geschwellte Jugularvene einer an staubfreiem Orte aufgestellten Kuh ohne Hautschnitt eingestochen und der nach Abnahme der Spritze (welche nur als Handhabe, nicht aber zur Blutentnahme zu dienen hat) aus der Nadel im Bogen abfließende Blutstrahl direkt mit dem Kolben aufgefangen, in dem sich schon der verflüssigte und auf 70° abgekühlte, 3proz. Agar mit 2proz. Traubenzuckerzusatz befindet. Wenn die eingeflossene Blutmenge schätzungsweise 20—30 Proz. des Kolbeninhaltes beträgt, wird der Kolben wieder verschlossen, leicht geschwenkt und dann im Laboratorium so lange stehen gelassen, bis der Inhalt auf etwa 45° abgekühlt ist, worauf die Platten gegossen werden. In so einfacher Art hergestellte Platten weisen fast nie Verunreinigungen auf. Der *Pyobazillus* wächst auf diesen Nährboden überaus rasch und üppig, so daß man die Kolonien anfangs für *Staphylokokken* halten möchte.

Der *Yüddersükbazillus* wächst im Gegensatz zum *Pyogenes*-Bazillus auf eiweißfreien Nährböden fast ebenso gut wie auf den oben angegebenen Nährböden, welcher Umstand zusammen mit seinem Wachstum bei Zimmertemperatur vielleicht bei seiner Reinzüchtung aus einem Gemisch von *Yüddersük*-mit *Pyogenes*-Bazillen Anwendung finden könnte.

Zur Aufbewahrung eignet sich am besten die Stichkultur in 25proz. Serumagar, in der die *Pyobazillen* ebenso wie der „*Mastitisbazillus*“ bei Zimmertemperatur mindestens 6 Wochen, oft aber bis 10 Wochen, lebend und fortpflanzungsfähig bleiben. Wie lange die beiden Bakterienarten im Laboratorium fortgezüchtet werden können, kann ich nicht angeben. Der Pfeilersche *Bazillus* wächst schon 8 Monate ausgezeichnet fort und ein *Pyogenes*-Stamm, der seit einem Jahr nur alle 3—6 Wochen überimpft wird, zeigt unverändert lebhafte Wachstumsenergie.

Form und Aussehen der Kulturen.

Das Aussehen der Serumbouillonkulturen ist schon oben eingehend beschrieben.

Die gewöhnlichen Bouillonkulturen sind ähnlich, nur bei den *Pyogenes*-Bazillen weniger üppig.

Bei der Stichkultur in Traubenzucker-Serum-Agar erfährt das Substrat nach wenigen Tagen um die reichlich gewachsene Kultur herum eine ziemlich erhebliche Trübung (wahrscheinlich durch Säurebildung).

Die tiefliegenden Kolonien der Serumagarplatte weisen bei beiden Arten wenig Charakteristisches auf. Es sind fein gekörnte, runde, elliptische,

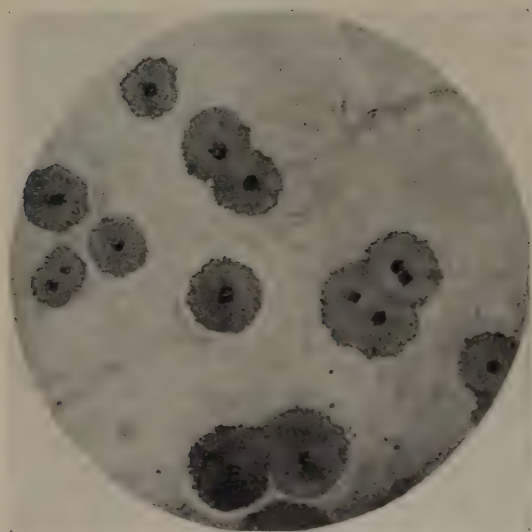


Fig. 3. 48stünd. Oberflächenkolonien des *Bacillus pyogenes* auf Agar mit 1 Proz. Traubenzucker- und 10 Proz. Rinderserumzusatz. Vergr. 1:40.

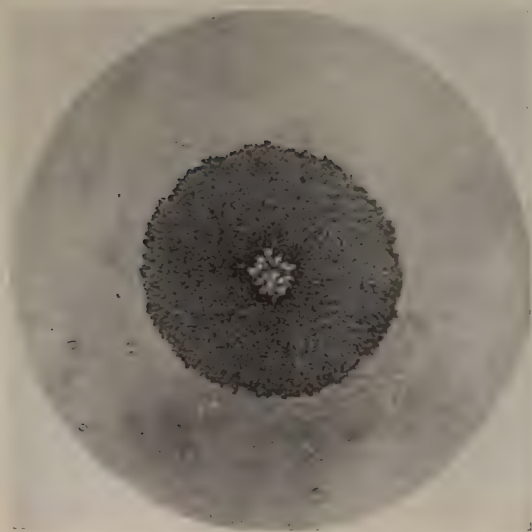


Fig. 4. Oberflächenkolonie des *Bacillus pyogenes* auf Traubenzucker-Rinderserum-Agar. Vergr. 1:120.

unregelmäßig vielkantige, sehr häufig wetzstein- oder linsenförmige Gebilde, wie man sie ähnlich auch bei anderen Bakterien findet. Wenn 2 Linsen- oder Wetzsteinkolonien sich nach Art eines Zwillingskristalles teilweise durchdringen, entstehen Herz- oder Pfeilspitzenformen.

Die Oberflächenkolonien des Pfeilerschen Bazillus stellen helle, saftig glänzende, opalisierende, runde, flache Gebilde dar, deren Durchmesser bis zu 4 mm erreichen kann. Bei schwacher Vergrößerung erscheinen die Kolonien hellbräunlich-gelb, ganz fein granuliert. Der Rand ist ziemlich scharf, eine Zackung kaum bemerkbar. Die Mitte der Kolonie erscheint dichter und enthält eine Ansammlung mehrerer im Zentrum gleich großer, gegen den Rand hin kleiner werdender runder, ovaler oder schollenartiger, bräunlicher Körner, die bei hoher Einstellung aufleuchten (Fig. 5). Solche Gebilde, wie sie ähnlich z. B. von Eisenberg als „Sekundärkolonien“ beschrieben wurden, kommen bei den verschiedensten Bakterienarten vor, wie überhaupt die Kolonie des Yüddersükbazillus wenig hervorstechende Eigenschaften besitzt.

Die Oberflächenkolonie des *Pyogenes*-Bazillus auf Rinderserumagar sieht ähnlich aus, gibt jedoch bei schwacher Vergrößerung ein ganz typisches Bild (Fig. 3 und 5). Die runden Kolonien, die dort, wo sie einzeln stehen, einen Durchmesser von $2\frac{1}{2}$ mm erreichen können, besitzen einen gezackten Rand, der bei jungen Kolonien oft so tief ausgefranst ist, daß der Eindruck des kreisförmigen

Umfanges der Kolonie geradezu aufgehoben sein kann. Die ganze Kolonie ist ziemlich gleichmäßig gekörnt oder fein gestrichelt, die Struktur

erscheint deutlich gröber als beispielsweise bei Yüddersük — oder bei Rotlaufkolonien. Im Zentrum trägt jede Kolonie ein recht scharf umrissenes, unregelmäßig geformtes, schollenartiges Gebilde, welches bei hoher Einstellung stark aufleuchtet und wie aus mehreren feineren, stark lichtbrechenden Körnchen kristalldrusenartig zusammengeklumpt erscheint (Fig. 4), was besonders bei Betrachtung mit dem binokulären Mikroskop bei scharfer Beleuchtung deutlich wird. Wird die Kolonie mit einem weichen Pinsel weggewischt, so bleibt an der Stelle der „Scholle“ eine leichte Vertiefung im Nährboden zurück. Diese „Scholle“ ist schon bei ganz jungen Kolonien vorhanden, die oft beinahe nur aus ihr bestehen; sie bleibt auch bei älteren Kolonien fast¹⁾ stets in der Einzahl und verleiht zusammen mit der gleichmäßigen, feinen Granulation und dem leicht zerfressenen Rand der Kolonie ein ganz typisches Aussehen, an welchem man sie in Mischkulturen sogleich erkennen kann (Fig. 5). Ich benütze zur Reinzüchtung des Pyogenes-Bazillus immer Platten von Agar mit 10—20 Proz. Rinder-serum und 1 Proz. Traubenzucker (oder Rinderblutagar 5 Proz.), auf welche ich mit einem Platinspatel das Material in mehreren Strichen aussäe. Mit dem Mikroskop können dann leicht einzelnstehende Pyogenes-Kolonien herausgesucht werden.

In der Literatur finde ich dieses einfache und sichere Kulturverfahren nirgends angeführt, was wohl einerseits damit zusammenhängt, daß die meisten Untersucher Strichkulturen nur auf Schrägagar anlegten, wo eine mikroskopische Besichtigung nicht stattfand, und daß andererseits in den meisten Instituten Pferdeserum verwendet wird. Auf Pferdeserumagar sah ich aber meistens Kolonien, welche mehrere „Schollen“ hatten und die dadurch z. B. den Yüddersükkolonien ähnelten.

Für die Diagnose reicht natürlich die mikroskopische Prüfung der Oberflächenkolonie nicht aus, um so mehr als auch andere, den Pyogenes-Kolonien auch makroskopisch ähnliche Bakterienkolonien gelegentlich eine ähnliche „Scholle“ zeigen (Bipolare, Abortus Bang). Doch ist damit die Trennung von Mischkulturen von Pyogenes-Bazillen mit anderen Bakterien (auch dem Yüddersükbaz.), die auf Schrägagar nie als solche erkannt werden können²⁾, leicht durchzuführen.

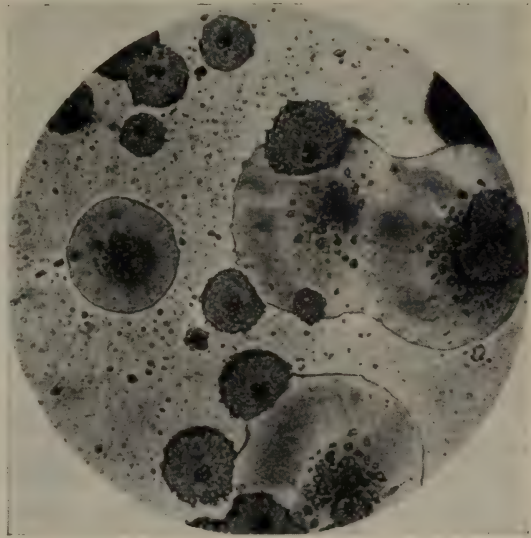


Fig. 5. Oberflächenkolonien einer Mischkultur des *Bac. pyogenes* mit dem Pfeilerschen Bazillus. Vergr. 1:40. (Die Kolonie des Pfeilerschen Bazillus sind auf dem sehr feuchten Serumagar rasch in die Breite gewachsen und haben in ihrem Zentrum eine größere Anzahl von „Schollen“ ausgebildet).

1) Manchmal entstehen auf der Blutagarplatte — nicht aber auf der Rinderserumagarplatte — um die zentrale Scholle herum mehrere Körnchen, die aber viel kleiner sind als jene.

2) Nach Olt werden in der Kultur häufig Streptokokken trotz Vorhandenseins übersehen,

Die Kolonien auf den schon erwähnten, zur „Mästung“ dienenden Traubenzuckerblutagarplatten erreichen einzeln stehend bei beiden Arten einen Durchmesser bis zu 4 mm; sie sind saftig glänzend, grau, beim *Pyogenes-Bazillus* überdies oft in der Mitte weiß und undurchscheinend.

Auf der Kartoffel bildet der Pfeilersche *Bazillus* einen gelblichweißen feuchten Belag.

Ueber das Aussehen der Kulturen in anderen Nährmedien wird noch füglich im folgenden Abschnitt, gelegentlich der Besprechung der chemischen Leistungen der Bazillen, berichtet.

Chemische Leistungen.

Eine merkliche Farbstoffbildung wurde bei keinem der untersuchten Stämme beobachtet.

Eine gewisse nicht ganz eindeutige Reduktion des Lackmusfarbstoffes durch den *Bac. pyogenes* tritt in Lackmusmilch (siehe auch unten) in Erscheinung. In den Yüddersükröhrchen zeigt sich zwar eine ganz leichte Aufhellung, die Farbe bleibt aber lila.

Neutralrot wird durch beide Arten nicht verändert.

Säurebildung ist, wie oben erwähnt, bei beiden Arten in gewöhnlichen flüssigen Nährböden, denen keine Kohlehydrate zugesetzt sind, nicht in bemerkenswertem Maße nachzuweisen.

Gasbildung war bei beiden Arten auf was immer für einem Nährboden nicht nachzuweisen.

Einige Verschiedenheiten zeigen sich wieder im Verhalten auf kohlehydrathaltigen Nährböden.

Barsiekow I wird vom Yüddersükbazillus in kurzer Zeit stark gerötet, später tritt Fällung ein. In den *Pyogenes*-Kulturen kommt es nur zu einer leichten Rötung, wenn aber Serum zugesetzt wurde, zeigt sich etwas stärkere Rötung und oft auch Trübung.

Barsiekow II wird durch den Yüddersükbazillus nur leicht gerötet und bleibt immer klar, der *Pyogenes-Bazillus* erzeugt etwas stärkere Rötung und — bei Serumzusatz — oft sogar Fällung von leichter Opaleszenz bis zu feiner Ausflockung.

Der Farbton der blauvioletten Lackmusmilch (Vollmilch mit Zusatz von 7proz. Lackmuslösung) wird durch den Yüddersükbazillus ganz leicht gegen rotlila verschoben und etwas aufgehellt. Der *Pyobazillus* erzeugt Gerinnung. Das Gerinnsel ist flockig, zum Teil geradezu fein krümelig und zieht sich im Laufe der Zeit zu einem zylindrischen, konischen, kugeligen oder ganz unregelmäßig geformten Klumpen zusammen, so daß oft $\frac{2}{3}$ des Röhrchens von einem beinahe vollkommen klaren Serum eingenommen werden.

Das Gerinnsel ist anfangs teils rotviolett, teils entfärbt (besonders in der Kuppe des Röhrchens und dort, wo es am Glas anliegt), später wird es ziemlich gleichmäßig rot, während das ausgepreßte Serum fast ganz klar ist und nur einen leise violetten, später roten Farbstich besitzt.

In Lackmusmilch mit Traubenzucker (2 Proz.) wächst auch der Yüddersükbazillus (entsprechend Barsiekow I) mit starker Rötung und Fällung des Kaseins, die aber ein ganz anderes Bild gibt als beim *Pyobazillus*. Das Gerinnsel ist nämlich gleichmäßig gallertig und preßt fast kein Serum aus.

Hetschlösung wird durch den Yüddersükbazillus leicht gerötet; durch den *Pyobazillus* wird sie, auch wenn sie Serum enthält, gar nicht verändert.

Auf Conradi-Drigalski-Agar konnte ich mit Serumzusatz die beiden Arten nicht zum Wachstum bringen.

Auf Endo-Agar wächst der *Pyobazillus* auch mit Serumzusatz nicht, der Pfeilersche *Bazillus* bildet — besonders schön, wenn Serum zugesetzt

was natürlich auch schon zu falschen Meinungen geführt haben kann. Sani konnte einen *Pyogenes*-Stamm weder durch Kultur noch durch Meerschweinchenpassage von mitwachsenden, allerdings in der Minderzahl bleibenden Diplokokken trennen.

wurde — intensiv rote Kolonien, ohne jedoch den Nährboden selbst auch nur in der allernächsten Umgebung derselben im geringsten zu röten. Ungefärbte Ausstriche aus solchen Kolonien lassen hellrot gefärbte Stäbchen erkennen.

Auf dem Wasserblau-Metachromgelbnährboden nach Gassner (mit Serumzusatz, — auch wenn durch Säurezusatz die durch das Serum erzeugte Gelbfärbung wieder in das ursprüngliche Grün übergeführt wurde) wachsen beide Arten ohne Veränderung des Farbtones.

Der *Bacillus pyogenes* besitzt in hohem Maße die Fähigkeit, Eiweißkörper abzubauen.

Bei 26° festbleibende Gelatine wird verflüssigt.

Sehr typisch ist die Verflüssigung von erstarrtem Serum. Schon im 1. Tag nach der Beimpfung tritt längs des ganzen Impfstiches eine Aufhellung des Nährbodens ein. Am 2. Tag ist schon stellenweise Verflüssigung zu bemerken, am 3. Tag ist längs des ganzen Stiches ein etwa 2 mm dicker Kanal ausgeschmolzen. Etwa vom 5. Tag an bilden sich radiäre, bis zur Glaswand des Röhrchens reichende Spalten im noch festem Teil des Serums, später auch Horizontalspalten und etwa am 10. Tag ist das ganze Substrat durch tiefe Klüfte in eckige Schollen zerlegt, die in einer vollständig wasserklaren, farblosen Flüssigkeit liegen. Eine gänzliche Auflösung dieser Schollen habe ich auch bei längst dauernder Beobachtung (in luftdicht verschlossenen Röhrchen) nicht gesehen, die Bakterien gingen früher zugrunde. Die Kulturen zeigen nicht den geringsten üblen Geruch. Der Beginn der Verflüssigung kann rascher bemerkt werden, wenn der Stich längs der Wand des Röhrchens und bis an den Grund geführt wird.

Der Pfeilersche Bazillus wächst in Gelatine und in erstarrtem Serum sehr gut, ohne das Substrat sichtlich zu verändern.

In Mischkulturen von *Pyogenes*-Bazillen mit *Yüddersükbazillen* tritt die Verflüssigung in genau der gleichen Weise wie bei *Pyogenes*-Reinkulturen ein.

Auf schrägerstarten Eiernährböden nach Lubenau wachsen beide Bakterienarten gut, der *Pyogenes*-Bazillus mit Verflüssigung des Substrates.

Wird der *Bac. pyogenes* auf eine dünne Agarplatte gestrichen, der 5 Proz. defibriniertes Pferdeblut zugesetzt ist, so tritt unter den Kolonien und in einem Umkreis von $\frac{1}{2}$ —1 mm um sie herum sehr rasch (24 Std.) eine durchgehende Klärung und Entfärbung des Nährbodens ein. In ähnlicher Weise zeigt sich diese Erscheinung bei Zusatz von 5 Proz. defibriniertem Rinderblut, 5 Proz. Vollblut, ebenso auf Zuckeragar mit Blut, dagegen tritt sie nicht ein, wenn der Agar beim Blutzusatz noch zu heiß war, ebensowenig ist sie auf der dicken „Mästungsblutagarplatte“ bemerkbar, wo nur eine Verdunkelung des Nährbodens um die Kolonien und unter denselben zu sehen ist. Vielleicht ist auf dieses verschiedene Verhalten von „Blutagarplatten“ die Verschiedenheit der Ansichten der Autoren über die hämolytische Fähigkeit des *B. pyogenes* zurückzuführen (Korth, Glage, Brown und Orcutt). In jüngster Zeit berichtet Thomas, daß um die *Pyogenes*-Kolonien herum „eine Entfärbung der nächstgelegenen Blutkörperchen“ eintritt. Man könnte dies so verstehen, daß die Blutkörperchen erhalten bleiben, das Hämoglobin jedoch zerstört oder in eine farblose Verbindung übergeführt würde. Ich glaube aber bestimmt, annehmen zu müssen, daß es sich in Wahrheit um eine echte Hämolyse handelt, das heißt, daß das Stroma oder die Hülle der Blutkörperchen zerstört oder so verändert wird, daß ihr unverändertes Hämoglobin frei löslich wird und sich im ganzen Agar verteilen kann, so daß die „hämolytischen“ Stellen relativ farblos erscheinen.

Zu dieser Annahme führten folgende Beobachtungen:

1) Die „hämolytischen“ Stellen der Blutagarplatte sind nicht nur relativ entfärbt, sondern klar durchsichtig.

2) Mit mittelstarken Trockensystemen können die roten Blutkörperchen der Platte, die einzeln und zu Gruppen zusammengeklumpt sind, deutlich als kreisrunde, kaum gründlich gefärbte und nur in dichter Lagerung rötliche Gebilde erkannt werden. In der Umgebung der Kolonien bekommen sie schon nach 24 Std. ein scholliges Aussehen und nehmen an Zahl ab. Nach 3—4tägigem Aufenthalt der Platte im Brutschrank sind nur mehr einzelne nebelartige, feingekörnte Flecke als vermutliche Ueberreste von Blutkörperchenklumpen am Rande der geklärten Felder bemerkbar, während in nächster Nähe der Kolonien überhaupt keine körperlichen Gebilde im Agar zu entdecken sind.

3) Wird das defibrinierte Blut, bevor es zum Agar zugesetzt wird, durch destilliertes Wasser hämolytisch gemacht, so erhält man Platten, welche durchsichtig sind und das Hämoglobin in gleichmäßiger Lösung enthalten. Auf diesen Platten tritt keine Entfärbung um die Kolonie ein, wohl aber eine vollkommene Klärung des Nährbodens, wenn derselbe gelegentlich einmal eine leichte Trübung durch die „Blutschatten“ aufwies.

4) Wird eine Blutagarplatte auf der ganzen Oberfläche möglichst gleichmäßig mit Pyogenes-Material beimpft, so wird nach einigen Tagen die ganze Platte fast gleichmäßig durchsichtig oder wenigstens stark durchscheinend, aber es tritt keine Entfärbung ein. Das Hämoglobin verteilt sich eben sozusagen „von allen Teilen der Platte nach allen Teilen der Platte“, so daß keine relativ farbstoffärmeren Stellen freibleiben.

5) In Bouillon, der 5 Proz. defibriniertes Pferdeblut zugesetzt ist, zeigt sich nach 24—48 Std. vollständige Hämolyse. Der Gehalt der klaren Flüssigkeit an Blutfarbstoff (Sahli) entspricht dem einer Mischung von 5 Teilen Blut mit 95 Teilen destill. Wasser. Der Farbstoff wird mit Hilfe des Spektroskopes als unverändertes Hämoglobin erkannt.

Wir werden also annehmen müssen, daß der *Bacillus pyogenes* die roten Blutkörperchen ebenso wie auch andere feste Eiweißkörper aufzulösen vermag. Der rote Blutfarbstoff wird gleich zu Beginn dieses Prozesses in Freiheit gesetzt.

Der Pfeilersche *Bacillus* besitzt keine hämolytischen Eigenschaften.

Eigenartig und bisher nicht ganz klargestellt ist auch das Verhalten des *Bac. pyogenes* in Milch, welche er etwa am 2. Tag im ganzen Röhrchen zur Gerinnung bringt. Holth, ferner Brown und Orcutt nehmen an, daß diese Kaseinfällung durch Säuerung bedingt sei. Diese Ansicht mußte ich schon deshalb für irrig halten, weil sich das Gerinnsel sehr stark von dem unterscheidet, wie es z. B. durch Milchsäurestreptokokken entsteht, wo es gleichmäßig gallertig ist und kein Serum auspreßt, während es in *Pyogenes*-Kulturen die oben (bei „Lackmusmilch“) beschriebenen Eigenschaften besitzt. Später scheint überdies ein Teil des Koagulums gelöst zu werden. Im Hinblick auf die sonstigen proteolytischen Fähigkeiten des *Pyogenes*-Bazillus wird man also annehmen müssen, daß es sich um eine Art Labwirkung handelt, wie sie von vielen proteolytischen Fermenten als erste Phase des Kaseinabbaues ausgeübt wird, der über Zwischenstufen (Parakaseine, Metakaseine) vor sich geht, deren Kalziumverbindungen unlöslich sind (Grimmer).

Diese Ansicht läßt sich durch folgende Beobachtungen stützen:

1) In Lackmusmilch tritt die Gerinnung oft schon vor dem Farbenumschlag ins Rötliche ein, so daß Säuerung nicht als Gerinnungsursache in Betracht kommen kann. (In Kulturen von säurebildenden Bakterien kommt es erst dann zur Ausfällung des Kaseins, wenn schon recht intensive Rötung eingetreten

ist). Das Andauern des bläulichen Farbtones bei eingetretener vollständiger Gerinnung läßt sich deutlicher darstellen, wenn zu jedem Röhrchen Lackmusmilch 1—2 Tropfen einer konzentrierten, durch Filtration bakterienfrei gemachten Lösung von Natrium bicarbonicum zugesetzt wurde.

2) In Lackmusmilch, deren Kalzium durch Zusatz von $1\frac{1}{2}$ ccm einer 4,5proz. wässerigen Lösung von oxalsaurem Natron pro Röhrchen ausgefällt wurde, kann 3 Tage nach der Einimpfung von *Pyogenes*-Bazillen wohl eine gewisse, deutliche Rötung, aber keine Gerinnung beobachtet werden (wohl aber in Kulturen von „Säurebildnern“). Nach Zusatz von 3—4 ccm einer 9proz. Lösung von milchsaurem Kalzium bildet sich bald ein voluminöser Niederschlag und die überstehende Flüssigkeit wird dünn und fast durchsichtig. Die unbeimpften, sonst gleich behandelten Kontrollen (die durch vorsichtigen, unter starkem Schütteln erfolgenden Zusatz verdünnter Milchsäure auf den Farbenton der *Pyogenes*-Röhrchen gebracht werden müssen), bleiben nach Kalziumzusatz milchig und es bildet sich außer einer geringen Menge Kalziumoxalat kein Niederschlag.

3) Zusatz von frischem Pferdeserum (1—3 ccm) zur Milch verzögert die Gerinnung um mehrere Tage oder hebt sie ganz auf. (Bei „Säurebildnern“ nicht!) Rinderserum wirkt weit weniger hemmend („Antilab“).

4) Bakterienfreies Filtrat (1—3 ccm) einer 8 Tage alten Kultur des *Bac. pyogenes* in (zur Inaktivierung des Serums gekochter, unfiltrierter) Serum-bouillon bringt in Lackmusmilch dieselbe Gerinnung und Schrumpfung des Kaseins hervor wie lebende Kultur, nur bleibt die Farbe blauviolett.

Um zu sehen, ob die starke Verkleinerung des Milchkoagulums nicht allein auf einer Schrumpfung, sondern auch auf einer teilweisen Auflösung der festen Masse beruhe, stellte ich folgende Versuche an:

1) Sterile Lackmusmilch wurde mit bakterienfrei filtrierter Lösung von käuflichem Lab versetzt. In mehreren Röhrchen wurden in der gleichmäßig und recht fest erstarrten Masse, welche in den Kontrollröhrchen während der ganzen Beobachtungszeit unverändert blieb, Stichkulturen mit dem *B. pyogenes* angelegt. Um den Stich herum trat Auflösung des Koagulums ein, so daß nach mehreren Tagen ein Kanal von etwa 1 cm Durchmesser entstand. Die ganze Masse wurde nie gelöst, die Bakterien stellten früher ihre Lebenstätigkeit ein.

2) Zu sterilisierter Milch wird die gleiche Menge frischen Rinderblutes einfließen gelassen. Nach 3tägigem Aufenthalte der Mischung im Brutschrank hat sich ein gelblichweißes, milchiges „Serum“ abgesetzt, welches praktisch so gut wie keine Fetttröpfchen, aber viel Kasein (sowohl durch Lab als auch durch Säurefällung nachzuweisen) enthält. Nun werden Platten aus Agar, welchem 10 Proz. dieses „Milchblutserums“ und 10 Proz. Lackmuslösung zugesetzt sind, mit dem *Pyogenes*-Bazillus beimpft. Um die Kolonien herum tritt vollkommene Klärung des sonst hornartig undurchsichtigen Substrates bei alkalisch bleibender Reaktion auf.

Durch den Pfeilerschen Bazillus und zuckervergärende Streptokokken kommt es nur bei Zusatz von Traubenzucker (bzw. Milchezucker zu einer Klärung, welche jedoch auf der Bildung von Säure beruht (Kaseinsäureverbindungen?), da sie immer erst bei Rötung des Nährbodens eintritt. Bei stärkerer Säuerung durch weitere Zuckervergärung oder wenn man in den Deckel der Petri-Schale (bei normaler, „verkehrter“ Brutschrankstellung) etwas Essigsäure schüttet, deren Dämpfen dann die Platte ausgesetzt ist, werden diese klaren Stellen wieder trüb (Fällung von Eiweiß durch die Agarkolloide bei saurer Reaktion; Lingelsheim), während sie beim *Pyobazillus* immer klar bleiben; die Eiweiß-

körper (auch das Kasein) müssen eben vom letzteren wirklich abgebaut worden sein.

Der Yüddersükbazillus verändert die Milch auch bei reichlichem Wachstum nicht sichtlich. Mischkulturen des *Bac. pyogenes* mit dem Pfeilerschen Bazillus in Lackmusmilch sind von Reinkulturen des ersteren nicht zu unterscheiden. Bei mehrmaliger Weiterzüchtung solcher Kulturen wuchsen immer beide Arten mitsammen, was aber nur durch ihre Trennung mittels der Serumagarplatte und darauffolgende weitere kulturelle Prüfung feststellbar war.

Auch die Kulturen des *Bacillus pyogenes* in Milch sind ebenso wie die des Yüddersükbazillus niemals übelriechend. Das Eutersekret von Kühen, die an einer *Pyogenes*-Mastitis leiden, weist hingegen fast immer einen üblen Geruch auf, dem wir geradezu diagnostische und prognostische Bedeutung beimessen. Auch Holth schließt aus einem übelriechenden Eutersekret mit großer Wahrscheinlichkeit auf das Vorhandensein des *B. pyogenes*. Nach Poels und nach Nielsen ist übler Geruch bei Pyobazillose immer vorhanden.

Ich beimpfte Nährböden, die aus geronnenem Blut, aus hitzeerstarrtem Blut oder aus Gemischen von Blut und Milch bestanden, mit *Pyogenes*-Bazillen, ferner mit Mischungen derselben mit verschiedenen Mastitisstreptokokken oder mit Mastitisstaphylokokken, endlich mit Mischungen aller 3 Bakteriengruppen, ohne jemals übelriechende Kulturen zu bekommen. Hingegen zeigte sich in einer anaëroben Kultur auf erstarrtem Serum, welches mit frischem Sekret von einer „reinen“ *Pyogenes*-Mastitis beimpft war, der charakteristische Geruch: Mit dem Pyobazillus waren sehr lange, feine, gramnegative Stäbchen und Fäden gewachsen (*Nekrosebazillus*), deren Anwesenheit im Sekret bei der mikroskopischen Prüfung nicht auffiel.

Wenn man aus diesem Befunde auch nicht allgemeingültig behaupten kann, der *Nekrosebazillus* sei bei jeder *Pyogenes*-Mastitis mit übelriechendem Eutersekret mit anwesend, weil der Pyobazillus im lebenden Euter ganz andere Wirkungen hervorbringen könnte als im Reagenzglas, so zeigt doch dieser Fall wieder deutlich, wie leicht man bei der üblichen Untersuchungsweise zu dem Schluß: „in Reinkultur — daher der Erreger“ kommen und dabei den vielleicht wirklichen Erreger einer Erscheinung übersehen kann.

Tierversuche.

Mit Kulturen des Pfeilerschen Bazillus wurden folgende Versuche ausgeführt:

1) In ein Euterviertel einer fast trockenstehenden Kuh wurde durch den Strichkanal die Abschwemmung einer 36stünd. Blutagarkultur mit 5 cem Bouillonkultur eingespritzt. Es entstand eine akute, katarrhalische Mastitis mit anfänglich starker Schwellung und vorübergehender Temperaturerhöhung auf 40,1°. Nach 2 Tagen waren alle klinischen Erscheinungen, nach 7 Tagen die Sekretveränderungen verschwunden. Yüddersükbazillen waren 2 Tage lang im Sekret kulturell nachzuweisen.

2) Ein steriles Melkröhrchen, welches mit der Spitze eine Blutagarkolonie betupft hatte, wurde in einen Strichkanal einer hochträchtigen Kuh eingeführt. (Beste Infektionsweise zur Erzeugung von chron. Streptokokkenmastitis). Keinerlei Erscheinungen.

3) Eine hochträchtige, trockenstehende Kuh bekam intravenös 10 cem Serumbouillonkultur. Gleichzeitig wurde das Euterparenchym eines Viertels durch Einstechen und Einspritzung einiger cem phys. Kochsalzlösung beschädigt.

Bald nach der Injektion trat eine Temperatursteigerung auf 41,4 und ein 3 Std. dauernder Schüttelfrost ein. Weiter keinerlei Erscheinungen.

4) Einer milchenden Kuh wurden 2 cem Bouillonkultur ins Parenchym injiziert: Vorübergehende Temperatursteigerung (40,2), durch einige Tage blutige Milch, in welcher keine Bazillen nachgewiesen werden konnten.

5) Hochträchtige Kuh; analoger Fall wie Nr. 4.

6) Eine Kalbin erhielt 2 cem intraparenchymatös. Keinerlei Krankheitserscheinungen.

7) Da Carré mit seinen Bazillen eine Erkrankung nur dann auslösen konnte, wenn er sie vorher in Milch ausgesät hatte, injizierte ich einer am Ende der Milchperiode stehenden, noch wenig milchenden Kuh 10 ccm einer 36stünd., gut gewachsenen Milchkultur des Yüddersük-bazillus in den Strichkanal. Außer einer 3 Tage dauernden, ganz leichten katarrhalischen Galaktophoritis traten keine Erscheinungen auf.

In keinem Falle konnte das Bild der „Yüddersük“ hervorgerufen werden, wenn auch die einigemal beobachteten Krankheitserscheinungen auf eine gewisse Giftigkeit der Kulturen hinwiesen. Diese negativen Ergebnisse sind nicht verwunderlich, wenn man bedenkt, daß es sich erstens um Stalltiere handelte, zweitens, daß der Pfeilersche Bazillus, der sich nach dem Bericht des Entdeckers erst allmählich an die künstlichen Nährböden gewöhnen mußte, bei dieser Anpassung möglicherweise auch seine Virulenz verloren haben könnte.

Mit Kulturen der von Prof. Klimmer überlassenen *Pyogenes*-Stämme wurden folgende Infektionsversuche angestellt:

1) In ein Euterviertel einer trockenstehenden Kuh wurde durch den Strichkanal die Abschwemmung einer Blutagarkultur mit 5 ccm Serumbouillonkultur eingespritzt. Es entstand eine leichte, chronisch-katarrhalische Galaktophoritis ohne jede Schwellung des Viertels, welche nach etwa 14 Tagen geheilt war.

2) Eine hochträchtige, trockenstehende Kuh wurde in der gleichen Weise wie die vorerwähnte behandelt. Bald nach der Injektion entstand eine Schwellung des Viertels, die am nächsten Tag verschwunden war. Das Sekret war nach dem Abkalben normal und bazillenfrei.

3) Eine hochträchtige Kuh erhielt kurze Zeit vor der Trockenstellung 2 ccm Serumbouillonkultur intraparenchymatös eingespritzt. Durch mehrere Tage wurden *Pyogenes*-Bazillen in der blutigen, leicht katarrhalisch veränderten Milch ausgeschieden. Später bildete sich an der Injektionsstelle ein nußgroßer, derber Knoten, der allmählich von selbst verschwand.

4) Eine hochträchtige Kuh bekam 10 ccm Serumbouillonkultur intravenös eingespritzt, Gleichzeitig wurde das Parenchym eines Viertels durch Einstechen und Einspritzung von physiolog. Kochsalzlösung beschädigt. Außer einer leichten Temperaturerhöhung (39,7°) zeigten sich zunächst keine Erscheinungen. Drei Wochen später abortierte die Kuh. Im Fruchtwasser, an den Kötyledonen und im Magen des Fötus waren Unmengen von „spindelförmigen“ *Pyogenes*-Bazillen zu finden. Einige Tage nach dem Abortus zeigte sich starke Schwellung der Karpal- und Tarsalgelenke, leichte Schwellung aller Fesselgelenke, hohes Fieber, rasche Abmagerung, Endometritis mit übelriechendem Uterusinhalt. Die Behandlung der Endometritis bestand in Einlegen von Kohlegranulatstäben, gründlicher Ausheberung des Uterus und Spülung mit Rivanollösung, auf welche merkliche Besserung eintrat. Als das Sekret eitrig dick war, wurde Lugolsche Lösung verwendet. Außerdem erhielt die Kuh Phlogetan in Mengen von 10, 15, 20, 25 ccm subkutan in 2tägigen Zwischenräumen. Der Zustand des Tieres besserte sich, die Gelenkschwellungen verschwanden in etwa 3 Wochen, die Endometritis war nicht zur vollkommenen Heilung zu bringen. Am Euter hat sich nie irgendein Symptom gezeigt, die stets unveränderte Milch enthielt nie *Pyogenes*-Bazillen.

Es ist interessant, daß auch durch den *Pyogenes*-Bazillus nie das typische Bild der Euterseuche hervorgerufen wurde. Bei der intravenösen Infektion zeigte sich, daß der verwendete Stamm wohl recht virulent war, er rief aber gerade nur die „Komplikationen“ der Euterseuche, jedoch keine Mastitis hervor.

Später hatte ich noch Gelegenheit, aus dem Sekret von einer akuten, parenchymatösen Mastitis (Stallkuh!), in dem Streptokokken, sowie Staphylokokken und *Pyogenes*-Bazillen in großer Menge vorhanden waren, mit Hilfe der Serumagarplatten schöne Einzelkulturen des letzteren gleich in erster Generation zu erhalten. Mit Material aus diesen Kolonien und einer daraus angelegten Serumbouillonkultur (2. Generation) bzw. Milchkultur (ebenfalls 2. Generation) wurde je ein Viertel einer Kuh durch den Strichkanal infiziert. Auch hier kam es zu einer leichten Galaktophoritis ohne Schwellung der Viertel, welche bald ohne Hinterlassung irgendeiner Spur verschwand.

Zusammenfassung.

Der Pfeilersche Bazillus ist durch eine oder mehrere lange Geißeln beweglich. Er wächst aërob und anaërob, jedoch nicht in stark konzentrierter

Kohlensäureatmosphäre. Er gedeiht auf eiweißfreien Nährböden und bei Zimmertemperatur fast ebenso gut wie bei Bruttemperatur. Aus Traubenzucker vermag er Säure zu bilden, in ganz unbedeutendem Maße auch aus Milchzucker. Auf Endo-Agar wächst er mit roten Kolonien ohne Rötung des Nährbodens. Feste Eiweißkörper vermag er nicht anzugreifen, Milch nicht zur Gerinnung zu bringen, Blutkörperchen nicht aufzulösen.

Der *Bacillus pyogenes* ist unbeweglich und geißellos. Er wächst aerob und anaerob und ebenso gut in fast reiner Kohlensäure. Er wächst nicht bei Zimmertemperatur. Seine ungestörte Entwicklung ist an die Anwesenheit von Eiweißkörpern im Nährboden gebunden. Die kohlenhydratvergärenden Eigenschaften des *Bac. pyogenes* sind wenig ausgeprägt und für die Artbestimmung nicht zu verwenden. Von großer Bedeutung sind aber seine stark ausgeprägten proteolytischen Fähigkeiten. Er verflüssigt feste Eiweißkörper ohne Bildung übelriechender Stoffe, löst rote Blutkörperchen, deren Hämoglobin er in Freiheit setzt und bringt Milch durch eine Art Labwirkung zur Gerinnung, wobei er das Koagulum später zum Teil wieder löst.

Der Pfeilersche Bazillus ist mit dem *Bac. pyogenes* nicht identisch; es handelt sich um vollständig verschiedene Arten.

Das Krankheitsbild der „Yüddersük“ ließ sich durch künstliche Uebertragung von Reinkulturen auf Kühe mit keiner der beiden Bakterienarten hervorrufen.

Mischkulturen des *Bac. pyogenes* mit dem Pfeilerschen Bazillus sind durch die gebräuchlichen Laboratoriumsuntersuchungsmethoden nicht leicht als solche zu erkennen, da der letztere, obwohl er durch Generationen hindurch mit dem ersteren mitwächst, durch keine positive Tätigkeit hervortritt und die Veränderungen, die der *Bac. pyogenes* in den Nährböden hervorbringt, nicht stört.

Zur Trennung der beiden Arten aus Gemischen wird am besten die Oberflächenkultur auf der Rinderblutagarplatte (5 Proz. defibr. Blut) verwendet. Allenfalls könnte die Züchtung in reiner Kohlensäureatmosphäre (zur Anreicherung des *Bac. pyogenes*) oder die Züchtung auf eiweißfreien Nährböden bei Zimmertemperatur (zur Anreicherung des Pfeilerschen Bazillus) herangezogen werden. Für die sichere Unterscheidung der erhaltenen Reinkulturen kommt die Stichkultur in erstarrtem Rinderserum (nahe der Glaswand und bis zum Boden des Röhrchens stechen) und die Kultur in Lackmusmilch, eventuell auch die Endo-Agarplatte in Betracht.

Die für die Reinzüchtung des *Bac. pyogenes* aus tierischem Material unbedingt erforderlichen einwandfreien Einzelkolonien erhält man am besten durch Oberflächenkultur auf 10–20proz. Serumagarplatten (mit 1–2proz. Traubenzucker), auf denen der Bazillus charakteristische, mit dem Mikroskop leicht erkennbare Kolonien bildet.

Literatur.

Berger, Ztschr. f. Infektionskr. d. Haust. Bd. 8. 1907. S. 101. — Brown u. Orcutt, zit. nach Korth. — Carré, ref. Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. Bd. 16. 1908. S. 86. — Ders.,

Ann. de l'Inst. Pasteur Vol. 26. 1912. p. 281. — Eisenberg, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 11. 1906. — Galli-Valerio, Schweiz. Arch. f. Tierhkd. Bd. 60. 1924. H. 8. — Glage, Ztschr. f. Fleisch- u. Milchhyg. Bd. 13. 1902. S. 166. — Grimmer, Lehrbuch der Chemie und Physiologie der Milch, Berlin 1926. — Grip s, Ztschr. f. Fleisch- u. Milchhyg. 1898. — Ders., Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 1903. — Ders., Glage u. Nieberle, Die Schweineseuche, Berlin 1904. — Heyck, Diss. Hannover 1920. — Holth, Ztschr. f. Infektionskr. d. Haust. Bd. 3. 1907. — Klimmer, Haupt u. Glöckner, Tierärztl. Rundschau. 1927. S. 150. —, Korth, Arch. f. wiss. u. prakt. Tierhkd. Bd. 52. S. 48—61. — Künnemann, Ebenda. Bd. 29. 1903. — v. Lingelsheim, Streptokokken, in Kolle-Wassermann: Handbuch d. path. Mikroorg. 1913. — Nielsen, Berl. Tierärztl. Wochenschr. 1908. S. 969. — Olt, Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 1904. — v. Ostertag u. Weichel, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 47. Beih. S. 218. — Pfeiler, Tierärztl. Rundschau. 1927. S. 6. — Ders., Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 102. 1927. S. 453. — Ders., Schlaak u. Thomsen, Tierärztl. Rundschau. 1927. S. 319. — Poels, ref. in Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 1911. S. 644. — Ders., Ebenda. S. 5 u. 1924. S. 197. — Reisinger, Monatsh. f. prakt. Tierheilkd. Bd. 19. 1908. S. 193. — Sani, Il Nuovo Ercolani. Bd. 31. 1926. H. 21. — Schlaak, Tierärztl. Rundschau. 1926. S. 786. — Seelemann, Berl. Tierärztl. Wochenschr. 1927. S. 361. — Stadie, Ztschr. f. Infektionskr. d. Haust. 1906. Bd. 1. — Thomas, Dissert. Leipzig. 1927. — Vielhauer, Ztschr. f. Tiermed. Bd. 11. 1907. S. 336. — Zeissler, Die Technik der Anaërobenzüchtung, in Kraus-Uhlenhuth, Mikrobiol. Technik.

Nachdruck verboten.

Malaria tertiana.

Die Entwicklung der Sporulationsform, Doppelinfektionen und Bemerkungen über die sogenannte Parthenogenese der Makrogameten¹⁾.

[Aus dem Institut für Tropenhygiene in Amsterdam.]

Von Prof. Dr. W. Schüffner.

Mit 7 Abbildungen im Text und 1 Tafel.

Auch dem Erfahrenen bringt die Mikroskopie des Blutes stets von neuem Ueberraschungen. Zwar muß er sich dann nicht selten überzeugen, daß das vermeintliche Neue alt war, oder es sind Dinge, die wohl gesehen, aber anders erklärt wurden, oder endlich wirklich Neues. Für jede dieser drei Kategorien enthält das Folgende Vorbilder.

I. Für die Entwicklung vom Ring zu reifen Schizonten gilt auch heute noch die Beschreibung, die Schaudinn bei seinen Studien in Rovigno festgelegt hat. Durch Zunahme von Protoplasma und Chromatin wächst das ringförmige Plasmodium, bis es etwa die Hälfte seiner definitiven Größe erreicht hat. Der Kern, der ursprünglich sehr dicht strukturiert war und sich darum mit dem Rot aus Romanowski dunkel rubinrot färbte, hat nun eine lockere Struktur angenommen: bei geeigneter Färbung kann man die dunkleren Chromosomen (Karyosomen) im Kernsaft liegen sehen. Besonders ältere Präparate lassen diese Feinheiten gut erkennen, weil sich in solchen der Kernsaft nicht mitfärbt. Es folgt nun die erste Teilung des Kernes, die nach Schaudinn nach Art einer primitiven Mitose verläuft. Bei den nun folgenden Teilungen ist davon nichts mehr zu sehen; es sind dann scheinbar nur Abschnürungen (Fig. 2), die sich wiederholen, bis der Zeitpunkt der eigentlichen Sporulation

1) Nach einem Vortrag vor der Ned. Vereeniging voor tropische Geneeskunde, 29. 1. 28.

erreicht ist. Die Kernteile nehmen nun Kugelform an; jeder umgibt sich mit einem blauen Protoplasmasaum, und so entsteht die für *Tertiana* charakteristische Morulaform.

In diesem letzten Akt nun tritt ein drittes Baumaterial auf, das, durch kräftige Romanowski-Färbung darzustellen, bisher übersehen oder wenigstens nicht beschrieben wurde (Fig. 3—5, 16). Die reife Sporulationsform erscheint nicht mehr in Blau und Rot, sondern sie hat einen ausgesprochen violetten Ton angenommen. Bei genauerem Zusehen wurde es deutlich, daß sich die einzelnen reifen Merozoiten mit einer Haut überzogen haben, einem Periplast, der mit dem Rot aus Romanowski durchscheinend gefärbt, dem Bilde den violetten Ton verleiht. An der Grenze von zwei Merozoiten, wo die zwei Farbenquanten aneinander stoßen und sich summieren, kommt die Färbung mehr dem Chromatinrot gleich (Fig. 3, 4). Der Ueberzug braucht nicht ganz geschlossen zu sein, oft bleibt eine Lücke, und dann leuchtet in diesem Sektor das unveränderte Blau des Protoplasmas auf — sehr zierliche Bilder gebend (Fig. 5). Die Ausbildung dieser Figuren hat eine gewisse Zeit nötig; man sieht daher Formen, die erst halbfertig sind, und wo neben reifen, bereits mit ihrer Haut versehenen Merozoiten noch Teile des Schizonten liegen, die nur Protoplasma und Kern enthalten (Fig. 3). Ferner kann man beobachten, daß bisweilen nicht alles Protoplasma zur Versorgung der Merozoiten verbraucht wird, und daß ein ansehnliches Stück als eine Art Restkörper abge-



Fig. 1.

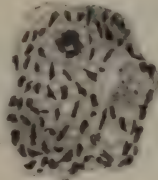


Fig. 2.

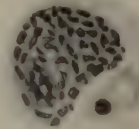


Fig. 3.

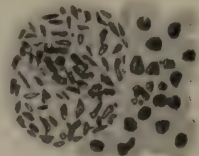


Fig. 4.

sondert wird (Fig. 4). Vermutlich sind dies die undefinierbaren, pigmententhaltenden Formen, denen man in manchen Präparaten begegnen kann.

Dieser Prozeß wird von Schaudinn angedeutet, wenn er schreibt: „Die Grenzen der einzelnen Merozoitenanlagen dringen von der Peripherie gegen das Innere allmählich vor und teilen das ganze Protoplasma in ebenso viele Zellen, wie Kerne vorhanden sind.“ Fügt man zu den „Grenzen“ das Attribut „violett gefärbt“, dann stimmt seine Beschreibung genau mit dem, was in meinen Präparaten zu sehen ist, überein. Man kann die Sporulation vergleichen mit einer Fruchtkapsel, wobei jeder Keim in seinem Fach liegt. Beim Aussäen würden dann die Merozoiten nackt in das Blutplasma kommen, eine leere Kapsel zurücklassend. Es wäre aber auch möglich, daß die Sporulationsform im ganzen auseinanderfällt, so daß die Merozoiten noch mit ihrer Hülle ins Plasma gelangen und diese erst ablegen, wenn sie von einem roten Blutkörperchen Besitz genommen haben. Sie könnte dann selbst als Schutz gegen die Abwehrkräfte des Plasmas Dienst tun. Bisher habe ich das nicht entscheiden können.

Bei der ersten bewußten Wahrnehmung dieser Erscheinung kam der Gedanke auf, daß die violett erscheinenden Merozoiten junge männliche Gameten waren. Ist es doch bekannt, daß das Protoplasma der Mikrogametozyten einen kräftigen Stich ins Rötliche besitzt. Dieser Gedanke mußte aber fallen, nachdem sich herausstellte, daß bei geeigneter Färbung alle Sporulationen sich violett färbten. Eine Differenzierung der Geschlechter in erster Anlage

habe ich übrigens auch sonst nicht finden können, ebensowenig wie Schaudinn.

Daß Schaudinn von den Zwischenwänden (etwa mit einer Enzystierung der Merozoiten auf eine Stufe zu stellen) nichts erwähnt, liegt wohl an der von ihm benutzten Farbflüssigkeit. Ebenso wie die Tüpfelung der Tertiana-parasiten, die Flecken von Maurer, die Kapsel des Halbmondes, oder, in ein anderes Gebiet springend, die Leptospiren, wird auch die Wand der Merozoiten allein dann sichtbar, wenn man kurz fixiert und über eine kräftig spezifisch färbende Romanowski-Giemsa verfügt. Nicht alle Farbmarken sind in dieser Hinsicht gleich. Hat man aber die richtige, dann imponiert bei langer Färbung, genügender Temperatur und richtiger Konzentration die violett erscheinende Wand neben dem Azurblau des Protoplasmas ungemein. Sie ist denn auch mehrfach in der Literatur richtig dargestellt. Man sehe Nocht und Mayer, Die Malaria, Fig. 22 und 11, hier selbst ein Protoplasma-rest angedeutet, oder Marchoux, Paludisme, S. 125. Auf den Tafeln von Ziemann, von Ruge und von Mühlens ist die Erscheinung nicht wiedergegeben. Wohl sind in der Monographie von Mühlens die Merozoiten der Quartana in violetterm Ton gehalten, ein Zeichen, daß auch bei dieser Malariaform das gleiche zu geschehen scheint. Auch Swellengrebel gibt in seiner Studie über Quartana Bilder, die als die rot gefärbten Scheidewände der Merozoiten aufgefaßt werden können. Gesehen ist daher die Erscheinung, nur die hier gegebene Auslegung ist neu.

Was hier während der letzten Periode der Schizogonie geschieht, darf nicht verwechselt werden mit Vorgängen an der Kernmasse des jüngeren Schizonten. Die dunklen Karyosome heben sich dann oft scharf von der blasser gefärbten Kernwand und der Kernsaftzone ab. Die Aquarelle von Metz und Blüml geben hiervon eine sehr getreue, die von Marchoux auf S. 125 eine mehr schematische, doch auch treffende Vorstellung. Abgesehen davon, daß die beiden Dinge nichts miteinander zu tun haben, unterscheiden sie sich auch prinzipiell: Die Haut der Merozoiten tritt bei starker Färbung, die Kerndetails besser bei schwacher Färbung zutage. Bei starker Farbeinwirkung werden die letzteren vollkommen überdeckt. Dies hat vermutlich Ziemann im Auge, wenn er schreibt: „Andererseits muß man sich stark vor Ueberfärbung hüten, da sonst die schon erwähnten Vorstadien des Chromatins, die in der Nähe des Chromatins liegen und die zur Bildung von neuem Chromatin während der eigentlichen Kernteilung beitragen, schon jetzt mitgefärbt werden können.“ An sich richtig, gilt diese Warnung nicht für die Haut der Merozoiten, die dann ungefärbt bleiben würde.

II. Doppelinfektionen von roten Blutkörperchen, bei *M. perniciosa* häufig, selten bei Tertiana als Ausnahmen. Doch kommen Fälle von Tertiana-fieber vor, wo man reichlich Doppelinfektionen sieht, und zwar alle Arten, von Kombinationen, junge und alte, Schizonten und Gameten in einer Zelle. 1908 wurde darauf schon von Metz und Blüml hingewiesen, später beschäftigte sich damit an unserem Institute besonders eingehend Rodenhuis. In einem seiner Fälle, wo im Durchschnitt 1 Plasmodium auf 200 Erythrozyten kam, fand Rodenhuis, daß von den infizierten Zellen jede 8. mit mehr als einem Parasiten besetzt war, während es nach der Wahrscheinlichkeitsrechnung 24mal weniger hätte sein müssen (d. h. also auch nur jede 200. Zelle). Die Erklärung sucht er in biologischen Unterschieden der Erythrozyten, von denen einzelne ihre natürliche Abwehrkraft verloren haben und nun dem Anfall der Merozoiten offen stehen. Oder auch umgekehrt: „daß bei bestehender relativer Immunität des Körpers (z. B. bei den Vorjahrsrezidiven oder nach langen latenten Perioden) Tertiana viele Doppelinfektionen verursachen kann, weil

sich die jungen Parasiten in dem Teil der roten Blutkörperchen aufhäufen, der noch keine Immunität erworben hat“ . . .

Blut dieser Art habe ich nun auch untersuchen können, und zwar stammte es von einem therapeutisch infizierten Paralytiker, das mir dankenswerterweise von Dr. Korteweg, dem verdienstvollen holländischen Malariaforscher, zur Verfügung gestellt wurde. Die durchschnittliche Zahl der Plasmodien war hier größer, etwa 1 auf 100 Erythrozyten, von den Infizierten etwa jeder 6. doppelt infiziert. Drei Ringe, bis zu 5 (Rodenhuis fand bis 6, auch Metz und Blüml) waren keine Seltenheit (Fig. 1). Auch rittlings dem Blutkörperchen aufsitzende Ringe kamen vor, so daß hier Merkmale, die wir sonst für die Diagnose *M. perniciosus* gebrauchen können, geradezu verwirrend wirkten.

Mit Recht sucht Rodenhuis die Ursache dieser Abweichung beim Wirt und nicht beim Parasiten. Unter anderen Umständen hätte man wohl an einen anderen Tertianastamm denken müssen. Das war hier ausgeschlossen; die Infektion stammte von einem alten holländischen Stamm, der schon in mehr als 20 Ueberimpfungen¹⁾ Dienst getan und immer das gewöhnliche Bild der Tertiana gegeben hatte. Dieser Fall lehrt daher besonders deutlich, daß das Bild der Tertiana einer gewissen Variabilität unterworfen ist, wohl abhängig von der Qualität des Blutes im Moment der Sporulation. Eine Warnung gegen voreilige Versuche, aus solchen Abweichungen das Bestehen von besonderen Sorten Malariaparasiten abzuleiten.

Nicht zutreffend ist nach meiner Meinung die Annahme Rodenhuis', daß der Verlauf der Malaria und ihre Wirkung auf den Wirt die Doppelinfektionen bedinge. Im vorliegenden Fall war weder von einer „langen Latenz“ noch von einem „Rezidiv mit langem Intervall“ und einer dadurch aufgekommenen Immunität die Rede. Es ging hier um eine nach Ueberimpfung prompt ausgebrochene frische Infektion. Die eigentlichen Faktoren sind uns daher noch unbekannt.

Was wird aus den mehrfachen Infektionen? Bei Doppelinfektion haben beide Parasiten Raum genug, um reif zu werden: sie füllen dann das rote Blutkörperchen bis zum Rande aus. Aber was wird daraus, wenn mehr als zwei Ringe einwandern? Reife Drillinge wurden bisher nicht gesehen. Wird einer ausgestoßen, oder gehen sie alle drei vorzeitig zugrunde? Teleologisch gedacht, würden dann solche bevorzugte Erythrozyten im Vorteil des Wirtes als eine Art Falle wirken, worin dieser Teil der Parasiten tot läuft.

Rodenhuis fand nun ferner, daß die mit einem Gameten besetzten Zellen eine besonders große Anziehungskraft hatten. Bei 300 Gameten, wovon 90 Proz. ♀ und 10 Proz. ♂, waren es 51, also 17 Proz., wobei noch 1—4 junge Schizonten eingewandert waren. Das war 34mal mehr, als es nach der Wahrscheinlichkeitsrechnung hätte sein dürfen.

Bei unserem Paralytiker, dessen Blut besonders reich an Gameten war, fand ich andere Verhältnisse. 46 Proz. kamen auf ♂ und 54 Proz. auf ♀. Mehrfach infiziert erwies sich bei den ♀ der vierte Teil, bei den ♂ nur der zwanzigste, also viel weniger. Da ungefähr 200 Gameten gezählt wurden, darf man den Zufall hier wohl ausschalten.

In beiden Fällen war also die anziehende Kraft der weiblichen Gameten noch stärker als die der Blutkörperchen allein und in unserem Falle viel stärker als die der männlichen. Ob dies das Gewöhnliche ist, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

1) In der Diskussion wies Dr. Korteweg daraufhin, daß in diesem Falle die Gametenbildung sehr reichlich war, im Gegensatz zu den Angaben von Wagner-Jauregg und Mitarbeitern; wonach Malariastämme nach wiederholter Ueberimpfung mittels Blut die Fähigkeit verlieren sollen, Gameten zu bilden.

Der eingedrungene Ring ist leicht zu erkennen, wenn er im freien Rande der Gametenzelle sitzt (Fig. 6, 7), und wenn man nur mäßig stark färbt (Maurer, 2. Grad). Beides, das dunkelrote Rubinkorn und das tief blaue Protoplasma verrät ihn. Doch sind auch solche Bilder verkannt und für Kernreduktionen angesehen.

Schwieriger wird die richtige Interpretation, wenn der Ring beim Eintrocknen auf den Gameten liegen blieb (Fig. 11), darauf hat Rodenhuis besonders aufmerksam gemacht. Er meint sogar, daß dann der junge Schizont geradezu im Leib des Gameten liegt, bald im Protoplasma, bald im Kern. Den Beweis hierfür entnimmt er Bildern, wobei das Pigment des Gameten vor dem Schizonten ausgewichen ist. Mir scheint es zweifelhaft, ob unsere Trockenpräparate eine solche Auslegung zulassen. Das Ausziehen des Blutropfens, dann das Trocknen der feinen Schicht kann auf die definitive Lage gewiß Einfluß haben. Im lebenden Blut, und darauf kommt es schließlich an, wird der kleine Schizont, das darf man wohl annehmen, den Teil der Zelle aufsuchen, wo er sich ansiedeln kann. Es ist darum auch nicht wahrscheinlich, daß der Gamet infolge der Invasion, wie Rodenhuis meint, zugrunde geht.

Bei ♂ fand Rodenhuis kleine Ringe nur im freien Rand der Blutzelle, nicht im eigentlichen Gametenleib (Fig. 12—14). Dies verschiedene Verhalten dient ihm als Stütze für seine Annahme, daß der Ring im Gametenleib para-

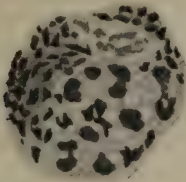


Fig. 5.

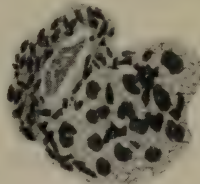


Fig. 6.

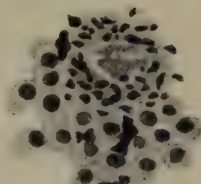


Fig. 7.

sitieren kann, aber eben nur im ♀. Ich habe hierfür eine andere Erklärung: Es scheint, als ob der ♂ von einer stärkeren elastischen Wand umgeben ist, die, unter Spannung stehend, ihm eine gleichmäßig ovale Form gibt und die sich durch Kräfte von außen nicht leicht verändert (s. auch weiter unten). Der ♀ dagegen besitzt keine eigentliche Wand, das Protoplasma liegt frei offen und gibt jedem Druck nach. Darum nimmt es auch den Ring, der beim Ausziehen des Blutropfens in der entsprechenden Lage liegen blieb, willig auf, während der Ring von dem starren Eirund des ♂ während der kritischen Zeit des Trocknens herabgleiten kann, um im Rand zur Ruhe zu kommen. Auf die Bedeutung dieser Bilder komme ich noch zurück.

Wie zu erwarten, war nun auch die Zahl der Doppelinfectionen mit erwachsenen Parasiten groß. Nur ausnahmsweise war dann zwischen Schizont und Gamet eine scharfe Grenze zu sehen, wie es J. D. Thomson angibt. Meist gehen die beiden Leiber ineinander über, jedoch so, daß man an dem Kontrast des etwas dunkler blauen Schizonten gegenüber dem schwächer blauen Protoplasma des ♀ die Grenze erkennen kann (Fig. 15, 16). Der ♀ ist, wie nach obiger Beschreibung zu erwarten, oft verzogen, sein Leib gibt gewöhnlich dem stärkeren Mitbewohner nach. Mit Nachdruck möchte ich hier betonen, daß alle diese Formen, die einer primären Infektion angehörten, übereinstimmten mit denen, die ich bei Rezidiven fand.

Endlich enthielt dies Blut auch ♂ mit erwachsenen Schizonten (Fig. 17, 18). Der junge Ring kann sich also auch bei einem ♂ weiter entwickeln. Allein ist die Reihe nun an ihm, seine Form aufzuopfern. Der Gamet schiebt sich gegen

die Wand des Blutkörperchens, ohne etwas von seinem feinen Oval aufzugeben: der Schizont muß sich in den sichelförmigen Raum drängen, den der Gamet läßt. Nachdem, was ich oben über den starrer Bau des ♂ sagte, war das zu erwarten.

Die Kombination ist an sich nicht überraschend. Warum sollte nicht auch ein ♂ doppelt infiziert werden? Aber es muß ein sehr seltenes Bild sein — sonst würde die Tatsache von den Gegnern der noch zu besprechenden Parthenogenese viel mehr ausgebeutet sein. Die einzige einwandfreie Abbildung, die mir in der Literatur bekannt ist, gibt Schaudinn selbst! (Textfig. Nr. 93).

III. Die „Parthenogenese“. In seiner klassischen Arbeit spricht Schaudinn den Gedanken aus, „daß die Rezidive nach langen Intervallen ihre Entstehung der Langlebigkeit der ♀ und ihrer Fähigkeit, sich wieder in Schizonten zurückzubilden, verdanken. Den Ausdruck Parthenogenese will er vermeiden. Trotzdem ist dieses Wort an seine Theorie gekuppelt geblieben, besonders in der ausländischen Literatur.

Es würde mich zu weit führen, wenn ich die Geschichte dieser Theorie ausführlich behandeln wollte. Bis in die jüngste Zeit sind die Meinungen verteilt geblieben. R. Ross, Craig, Bignami, Ruge, James, I. D. Thomson und Knowles waren dagegen, der letzte endigt 1925 mit den Worten: „The theory of parthenogenesis is as dead as mutton“. Bestätigend drückten sich aus zuerst die Holländer Terburgh, v. d. Hilst Karrewy, Metz und Blüml, Neeb, dann Nocht, v. Prowazek, Seyfarth und Marchoux, der 1926 in seiner Monographie das Kapitel abschließt mit den Worten: „Il ne persiste donc aucune objection sérieuse à la conception de l'origine parthénogénétique des rechutes“. Und zwischen diesen beiden Extremen stehen Ziemann, Mühlens und gegenwärtig wohl auch Nocht und Mayer, die die Möglichkeit einer Rückbildung offen lassen, aber meinen, daß man sie für die Erklärung der Rezidive nicht nötig hat.

In der Hauptsache geht es um die Frage, hat Schaudinn als Schizogonie beschrieben, was in Wirklichkeit Doppelinfectionen waren? Die Entscheidung hierüber würde viel einfacher sein, wenn Schaudinn in seiner Arbeit die Doppelinfectionen nicht nannte. Man konnte dann eher annehmen, daß er sie nicht kannte, so unwahrscheinlich das auch bei einem Forscher wie Schaudinn klingen müßte. Aber er kennt die Bilder wohl, zeichnet sogar einige, und darunter — Zufall oder Absicht — die allerseltenste Kombination, ♂ plus Sporulation! Mit einem auf der Hand liegenden Irrtum, wie manche seiner Gegner meinen, hat man es darum nicht zu tun.

Allerdings hat es Schaudinn auch seinen Anhängern schwierig gemacht, da er die Doppelinfectionen nur kurz erwähnt und nicht weiter auf die Gefahr einer Verwechslung eingeht. Vermutlich würde er sich in einer zweiten Arbeit darüber ausgelassen haben, wenn nicht der Tod allen weiteren Plänen ein Ende gemacht hätte. So bleiben wir auf seine erste und einzige, noch fragmentarische Studie angewiesen.

Gibt es nun Merkmale, um die beiden nach Schaudinn prinzipiell verschiedenen Formen voneinander zu unterscheiden?

Die reife Doppelinfection — nur über diese habe ich eigene Erfahrung — zeichnet sich aus durch ihre Größe. Das an sich geschwollene Blutkörperchen wird durch die beiden erwachsenen Parasiten bis zum Rande ausgefüllt. Das ist eine regelmäßig wahrzunehmende Erscheinung; eine Scheidungslinie kann, wie oben schon bemerkt, fehlen (vgl. Tafel).

Die Sporulation des ♀ müßte auf andere Weise entstehen, wenigstens, wenn wir uns an den Ausdruck „Rückbildung“, den Schaudinn benutzt, halten. Eine Vergrößerung des Volumens ist hier nicht zu erwarten, der ♀

geht ja in den Schizont über, er liefert selbst das Material, wird aufgebraucht bis auf einen Rest, der abstirbt.

Auf der Tafel von Schaudinn kommt das jedoch nicht zum Ausdruck, es sei denn, daß man annehmen will, daß er für seine Figuren Ausnahmen wählte. Die Schizogonien des ♀ in Nr. 108, 109, 110 sind ebenso groß, wie die von ihm selbst gegebene Doppelinfektion in Nr. 93. Das stimmt also nicht mit dem soeben gefolgten Gedankengang. Nun kann man zwar die Situation retten durch die Annahme, daß der Keim, der vom ♀ abgeschieden wird, um schizogenetisch zu leben, sich von außen nährt, ebenso wie es ein eingedrungener Ring tun würde. Aber davon sagt Schaudinn nichts, und außerdem steht dieser Auffassung eine andere im Wege, die wir bei Schaudinn finden. Er meinte damals noch, daß sich die Gameten, bevor sie reif geworden, ihres Zellrestes entledigten und nun frei im Plasma herumtrieben. Tatsächlich zeigen das seine Figuren, der ♂ in Nr. 93 liegt noch in der Blutzelle, während die Schizogonien des ♀ in Nr. 108—110 davon frei sind. Hier würde also für den jungen Keim keine Reservenahrung vorrätig sein. Heute wissen wir wohl, daß der Gamet mit seinem Zellrest verbunden bleibt, und daß unsere Sorge daher unnötig ist. Aber so hat es sich Schaudinn nicht vorgestellt. Wie man daher auch die Sache dreht und wendet, man kommt durch die Figuren von Schaudinn nicht zu festen Schlüssen. Man kann eine Verwechslung nicht beweisen, aber auch nicht ausschließen, und darum muß der Zweifel an seiner Theorie bleiben.

Endlich will ich mit Rodenhuis noch daran erinnern, daß Bilder von den ersten Anfängen der Schizogonie eines ♀, Nr. 104—106, leicht durch Schizonten geliefert werden können, die auf dem Gametenleib liegen blieben. Eine Untersuchung, die dieser Klippe, zuerst von Rodenhuis gesehen, nicht Rechnung trägt, kann daher heute nicht als vollständig angesehen werden.

Was nun im übrigen als Schizogonie von ♀ in der Literatur abgebildet ist (nur reife Formen), trägt nach meiner Meinung durchgehends den Stempel der Doppelinfektion. Man überzeuge sich hiervon durch einen Blick auf die Tafeln von Metz und Blüml, Nocht und Mayer, Mühlens (Fig. 13) und Marchoux. Sie unterscheiden sich in nichts von den Figuren, die von anderen, Ruge, Lehmann und Mayer, Manson, Archibald und Byam als Doppelinfektionen gegeben werden. Ueberall sind es stark vergrößerte Zellen mit zwei vollwertigen Parasiten, nichts deutet darauf, daß der ♀ untergegangen ist, und das gehört doch nach dem Schöpfer der Theorie zum Bilde. Noch weniger findet man etwas über die Anfangsstadien der sogenannten „Rückbildung“. Das letzte Wort über die Theorie Schaudinns muß daher immer noch gesprochen werden, wohl ein Zeichen dafür, welch ein bedeutender Einfluß von diesem großen Forscher ausgegangen ist!

Zusammenfassung.

Im letzten Akt der Schizogonie, bei der Bildung der Sporulationsform, tritt ein neues Baumaterial auf, das mit kräftiger Giemsa-Färbung einen violetten Farbenton annimmt und das als die Wand der Merozoiten aufgefaßt wurde.

Unter noch unbekannten Bedingungen, wohl mit dem Zustand des Wirtes im Zusammenhang, kann *M. tertiana* mit zahlreichen Doppel- und Mehrfachinfektionen der roten Blutzellen erscheinen. Die Angabe von Rodenhuis wird bestätigt, daß es unter anderen vor allem die Makrogameten sind, die für eine Superinfektion prädestiniert sein müssen. Doch wird auch die sehr

seltene reife Doppelinfektion von Mikrogametozyten beobachtet. Aus den hier beschriebenen Bildern konnte, ebensowenig wie aus den in der Literatur bekannt gewordenen eine Bestätigung der Theorie von Schaudinn von der Rückbildung der Makrogameten herausgelesen werden.

Erklärung der Tafelabbildungen (aquarellierte Mikrophotos) Vergr. 1:1500.

Fig. 1. Vierfache Besetzung eines Blutkörperchens.

Fig. 2. Reifende Schizonten; im blauen Protoplasma liegen die roten Chromatinblöcke.

Fig. 3. Halbfertige Sporulation, an der unteren Seite bereits Merozoiten mit Haut und Zwischenwänden sichtbar, in der Mitte und dem oberen Teil der Prozeß der Abgrenzung noch nicht begonnen.

Fig. 4—5. Reife Sporulation, in Fig. 4 oben noch ein typischer Protoplasma-rest.

Fig. 6—11. Doppelinfektionen: ♀ mit jungen Ringen.

Fig. 8. Dreifache Infektion, ♀ mit halbgroßem und jüngstem Schizont.

Fig. 12—14. Doppelinfektionen: ♂ mit jungen Ringen.

Fig. 15—16. Doppelinfektionen: ♀ mit erwachsenem Schizont bzw. Sporulation.

Fig. 17—18. Doppelinfektionen: ♂ mit erwachsenen Schizonten.

Fig. 19. Doppelinfektion: ♀ und ♂ in einer Zelle.

Nachdruck verboten.

Paravakzination und Paravakzinotherapie bei Krebs.

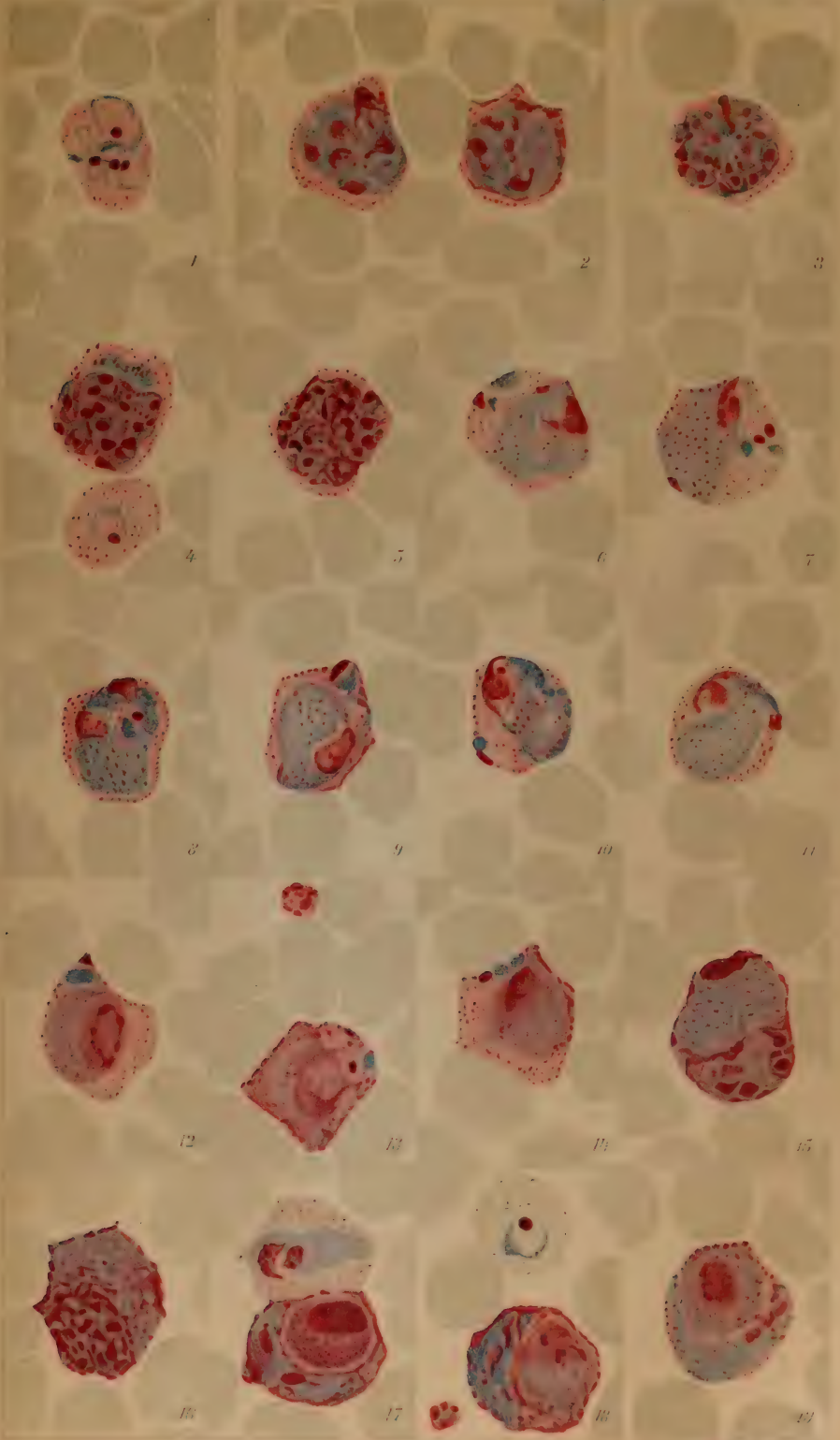
[Aus dem Hygienischen Institut der kgl. Universität zu Modena).]

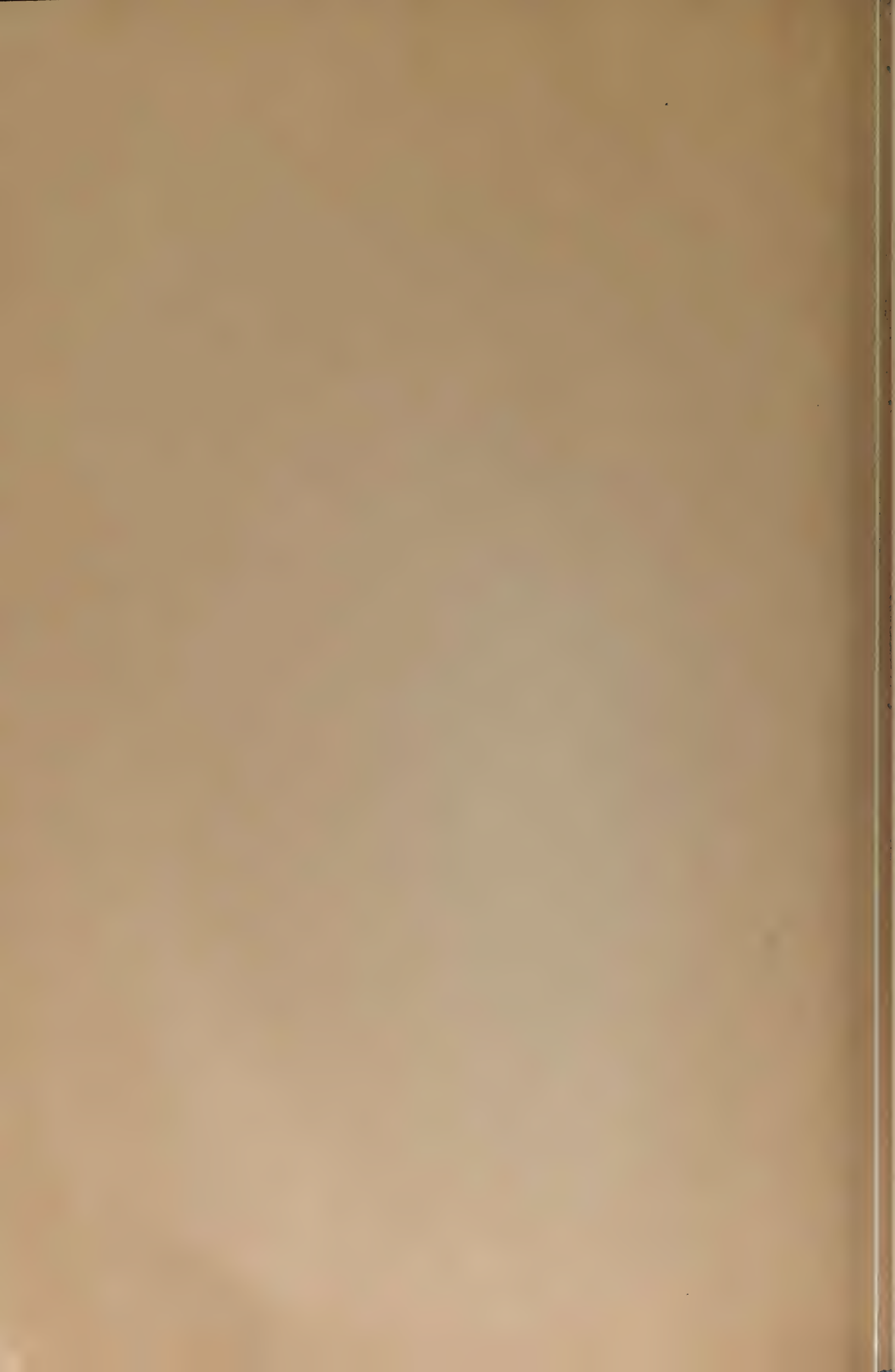
Untersuchungen von Prof. **Francesco Sanfelice.**

I.

Will man bei Versuchstieren Immunität gegen eine durch pathogene Blastomyzeten erzeugte Infektion erlangen, so bedient man sich der Abschwächung der Keime mittels physikalischer oder chemischer Agentien. Ich hatte in einer schon vor Jahren veröffentlichten Arbeit gezeigt, daß durch hohe Temperaturen die Kulturen pathogener Blastomyzeten rasch abgeschwächt werden. Setzt man Kulturen von pathogenen Blastomyzeten während 20—30 Min. einer Temperatur von 60°C aus, so sind sie nun nicht mehr imstande, die Versuchstiere zu töten, während sie sich nach der Ueberimpfung in den weiteren Kulturen noch üppig entwickeln. Der Austrocknung widerstehen hingegen die pathogenen Blastomyzeten lange Zeit, ohne Beeinträchtigung ihrer Lebensfähigkeit und ihrer Virulenz. Meerschweinchen, bei denen die durch Hitze abgeschwächten Kulturen pathogener Blastomyzeten eingespritzt wurden, vertragen ohne weiteres die Injektion virulenter Kulturen derselben Blastomyzeten. Zum gleichen Resultat führt die Behandlung der Versuchstiere mit Kulturen pathogener Blastomyzeten, die mit 0,5proz. Karbolsäure abgetötet wurden. Behandelt man den Kulturrasen mit 0,5proz. Karbolsäurelösung, so sterben die pathogenen Blastomyzeten nach 3tägiger Aufbewahrung bei Zimmertemperatur (18—20°C). Durch die subkutane Einführung solcher Aufschwemmungen von mit Karbolsäure abgetöteten pathogenen Blastomyzeten kann man die Versuchstiere gegen eine subkutane Injektion der gleichen pathogenen Blastomyzeten immunisieren.

Bei mit einer Blastomyzeteninfektion befallenen Tieren oder Menschen können subkutane Einführungen von durch 0,5proz. Karbolsäurelösung abge-





töteten Blastomyzeten zu sehr günstigen Resultaten führen. Werden Meer-schweinchen und Kaninchen subkutan pathogene Blastomyzeten eingespritzt und einige Tage später, wenn an der Injektionsstelle die Achsel- und Leisten-drüsen gut tastbar sind, die Tiere wiederholt subkutan mit denselben pathogenen Blastomyzeten behandelt, die aber im voraus durch 0,5proz. Karbolsäurelösung abgetötet worden sind, so ist dadurch die Heilung der Tiere leicht zu bewerk-stelligen. In gleicher Weise kam ein Fall von Lungen-Blastomykose beim Menschen zur Heilung, nachdem der Kulturrasen des aus dem Sputum isolierten und mit 0,5proz. Karbolsäurelösung abgetöteten Blastomyzeten wiederholt subkutan eingespritzt wurde, während vorher mit der üblichen Guajakol-, Jodkalium- und Arsenbehandlung keine Besserung zu erreichen gewesen war.

Im Laufe der letzten Jahre sind die oben angedeuteten Untersuchungen von anderen Forschern bestätigt worden. Forgeot hat Kryptokokkenkulturen dem Einfluß der Temperatur ausgesetzt, dieselben hierauf kryptokokkenwurmkranken Tieren eingespritzt und damit bei einem ziemlich hohen Prozentsatz der Fälle Heilung erwirkt. Boquet und Negre konnten einen wirksamen Kryptokokkenwurmpfiffstoff gewinnen, indem sie den Kulturrasen in 0,5-proz. Karbolsäurelösung aufschwemmten und ihn $\frac{3}{4}$ Std. lang einer Temperatur von 65° C aussetzten. Larioux, der den nach Angaben obiger Autoren hergestellten Impffstoff bei kryptokokkenwurmkranken Pferden einspritzte, hatte ebenfalls eine beträchtliche Zahl von Heilungen zu verzeichnen. 2 andere Forscher, Jaubert und Goy, stellten bei einer durch Blastomyzeten hervorgerufenen Alteration der Nägel eine Autovakzine aus der isolierten Kultur her, die dem Einfluß der Wärme und des Jods ausgesetzt worden war. Diese Be-handlungsmethode führte zur Heilung. Eine erhebliche Anzahl von Heilungen erhielt auch Bardelli, der seinen Impffstoff herstellte, indem er den Rasen von Kryptokokkenkulturen in 0,5proz. Karbolsäurelösung aufschwemmte und 1 Std. und 45 Min. einer Temperatur von 65—67° C aussetzte.

Besser führt bei der Immunisierung und bei der Behandlung von Infektionen und Intoxikationen die Paravakzination und Paravakzinotherapie zum Ziele. Bedient man sich pathogener Keime, die durch physikalische oder chemische Agentien abgeschwächt sind, so läuft man Gefahr, daß bei einzelnen Individuen die Virulenz der abgeschwächten Keime neuerdings aufflackern und Infektion erzeugen kann. Die Zurückhaltung, mit der die Immunisierungsmethode bei Tuberkulose nach dem Verfahren von Calmette aufgenommen wird, ist keineswegs ungerechtfertigt, weil der von diesem Forscher hergestellte Impffstoff aus lebendigen Perlsuchtbazillen besteht, deren Abschwächung durch mehr-monatliches Wachstum auf mit Galle getränkten Kartoffeln erreicht wird. Taillens, Direktor der Universitätskinderklinik zu Lausanne, hat unlängst bei einem mit der Calmetteschen Vakzine geimpften Kinde eine Meningitis tuberkulöser Natur tötlichen Ausgangs beobachtet. 2 Möglichkeiten liegen in diesem Falle vor: entweder hat die Vakzination das Kind nicht vor der Tuber-kulose geschützt, oder aber es wurde durch die Impfung die Krankheit erzeugt.

Bei der Paravakzination, wie bei der Paravakzinotherapie ist die Gefahr, es könnten sich die eingespritzten Keime virulentieren und eine Infektion herbeiführen, gänzlich ausgeschlossen. Die Wiederherstellung der Virulenz ist nur nach einem längeren Verweilen im auf 37° eingestellten Brutschrank und nach zahlreichen Passagen in Tieren ein und derselben Gattung erreichbar; erfolgt hingegen die Züchtung bei einer Zimmertemperatur von 15—18° C, so ist es noch niemals vorgekommen, daß die Parabazillen bei den Versuchstieren zur Infektion und zum Tode geführt hätten.

In zahlreichen, während der letzten Jahre veröffentlichten Arbeiten habe ich den Nachweis erbracht, daß es leicht gelingt, aus dem Sputum von Lungen-tuberkulosen, sowie aus den Organen von Versuchstieren, die der subkutanen Einspritzung eines tuberkulösen Sputums oder einer Reinkultur von Tuberkel-bazillen erlegen sind, säurefeste Tuberkelbazillen zu isolieren, die nach andau-

ernder Züchtung bei 37° und nach vielen Tierpassagen bei ein und derselben Gattung Virulenz erwerben und sich in echte Tuberkelbazillen umwandeln können. Meine Resultate wurden von Kolle bestätigt. Die Tuberkelbazillen gehen, infolge der Reaktion des Organismus, eine Umwandlung von Parasiten zu Saprophyten ein, in welch letzterem Zustand sie, selbst bei Einspritzung beträchtlicher Dosen, im Tierkörper keine Infektion mehr auszulösen vermögen.

Ich habe ferner nachgewiesen, daß diese Paratuberkelbazillen, wenn in den Tierkörper eingeführt, das Vermögen besitzen, gegen eine Infektion durch echte Tuberkelbazillen zu immunisieren, oder eine bereits bestehende Tuberkulose zu heilen. Die Paratuberkulosevakzine, die schon seit mehreren Jahren bei den verschiedensten Formen der menschlichen Tuberkulose Verwendung findet, hat zu sehr günstigen Resultaten geführt, ohne bei den mit hohen Dosen behandelten Patienten den geringsten Schaden zu verursachen.

II.

Angesichts der Tatsache, daß Paratuberkelbazillen die Versuchstiere vor einer Infektion durch Tuberkelbazillen schützen und die bereits an Tuberkulose erkrankten Tiere und Menschen vom Tode retten können, war mir daran gelegen, unter den *Blastomycetes paraneoformans*, die morphologisch und kulturell den *Blastomycetes neoformans* gleichen, Individuen aufzufinden, die kein pathogenes Vermögen besitzen, um damit Immunisierungsversuche anzustellen oder bei an Blastomyzeteninfektion oder Intoxikation leidenden Tieren und Menschen die Behandlung einzuleiten. Ich suchte die *Blastomycetes paraneoformans* im Erdboden, wobei ich das Material aus verschiedenen Tiefen entnahm, im Staube des Zimmerbodens, im Obst, in trockenen Zerealien und im Gemüse. Dieses Material wurde in Gläsern aufbewahrt, welche bei 15–18° sterilisierten Orangen- oder Zitronensaft enthielten. Nach etlichen Tagen habe ich dann die Flüssigkeit in frischen oder farbigen Präparaten mikroskopisch untersucht, und, falls Blastomyzeten vorhanden waren, Plattenkulturen auf Agar mit saurer Reaktion angelegt, um dann aus den Kolonien die Reinkulturen zu erhalten. So ist es mir gelungen, eine Gruppe *Blastomycetes paraneoformans* zu erhalten, die vom morphologischen und kulturellen Standpunkt aus mit den *Blastomycetes neoformans* übereinstimmen, die aber, wenn intravenös, intraperitoneal oder ins subkutane Bindegewebe eingeführt, für die üblichen Versuchstiere nicht pathogen waren. Nachdem ich mich überzeugt hatte, daß, selbst bei Anwendung hoher Dosen, Kaninchen und Meerschweinchen, die damit intravenös, intraperitoneal oder subkutan behandelt wurden, am Leben blieben und nicht an Gewicht abnahmen, begann ich mit den eigentlichen Immunisierungsversuchen. 2 Versuchsreihen hatten die Immunisierung gegen eine Blastomyzeteninfektion zum Zweck, und zwar wurde die eine bei Kaninchen, die andere aber bei Meerschweinchen angestellt: eine 3., an Ratten ausgeführte Versuchsreihe, war dazu bestimmt, die Entwicklung eines in einer meiner früheren Arbeiten beschriebenen Sarkoms zu verhüten.

Die Kaninchen wurden 3–4mal, mit 4–5tägigen Zeitabständen, mit Aufschwemmungen des Kulturrasens der *Blastomycetes paraneoformans* geimpft und 4 Tage nach der letzten Infektion intravenös mit Blastomyzeten *neoformans* infiziert. Gleichzeitig erhielt ein vorher nicht behandeltes Kaninchen intravenös die gleiche Dosis einer Aufschwemmung der pathogenen Blastomyzeten in physiol. Kochsalzlösung. Von den im voraus intravenös mit *Blastomycetes paraneoformans* geimpften Kaninchen ist kein einziges verendet, während die nicht behandelten Tiere insgesamt eingingen, mit

Diffusion der pathogenen Blastomyceten hauptsächlich in den Lungen, in der Milz und in den Nieren.

Bei den Meerschweinchen wurden *Blastomycetes paraneoformans* 2—3mal, mit 4—5tägigen Intervallen intraperitoneal eingespritzt, worauf man den Tieren 5—6 Tage nach der letzten Injektion einen pathogenen Saccharomyceten in das Peritoneum einführte. Ein nicht vorbehandeltes Meerschweinchen erhielt gleichzeitig intraperitoneal dieselbe Dosis des pathogenen Saccharomyceten in physiol. Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Auch bei dieser Versuchsreihe überlebten die vorbehandelten Meerschweinchen; die Kontrolltiere hingegen erlagen der Infektion nach 25—30 Tagen, mit Diffusion der Saccharomyceten im großen Omentum, in den Lungen, in der Milz und in den Nieren. Die Kaninchen sowohl, wie die Meerschweinchen, welche die Einspritzung pathogener Saccharomyceten vertrugen, weil sie immunisiert waren, wurden nach einigen Monaten getötet und sezirt; bei der Autopsie war keine durch pathogene Saccharomyceten erzeugte Läsion nachzuweisen.

Beim Studium der Immunisierung von Ratten, um bei diesen Tieren die Entwicklung eingepfhten Sarkoms zu verhüten, wurden in das Abdomen in physiol. Kochsalzlösung aufgeschwemmte *Saccharomycetes paraneoformans* eingespritzt, und zwar 3—4mal mit Zeitabständen von 6—7 Tagen. 5—6 Tage nach der letzten Injektion wurde diesen Tieren ein, aus einer kurz zuvor getöteten Ratte entnommenes Sarkomfragment ins Peritoneum eingepfht, und gleichzeitig dieselbe Zahl normaler, nicht mit *Blastomycetes paraneoformans* vorbehandelte Ratten mit kleinen Sarkomfragmenten aus der gleichen Ratte injiziert. Mehrere der Kontrollratten verendeten nach einigen Monaten mit Diffusion des Sarkoms im großen Omentum und in den Organen; von den mit *Blastomycetes paraneoformans* vorbehandelten Ratten verendete hingegen nicht eine einzige. Als nach mehreren Monaten diese Tiere geopfert wurden, ergab die Autopsie keinen abnormen Befund.

In Anbetracht der günstigen Resultate, die bei der Immunisierung der Versuchstiere mittels einer vorbeugenden Behandlung mit *Blastomycetes paraneoformans* erzielt worden sind, schien es von Interesse, nunmehr weitere Versuchsreihen anzustellen, um nachzuweisen, ob die gleichen *Blastomycetes paraneoformans*, wenn in Tiere eingespritzt, bei denen eine Blastomyceteninfektion besteht oder ein bereits gut entwickeltes Sarkom vorhanden ist imstande wären, den tödlichen Ausfall zu verhüten. Zu diesem Zwecke wurden die Kaninchen intravenös und die Meerschweinchen intraperitoneal mit pathogenen Saccharomyceten behandelt. 10—15 Tage später leitete ich eine Behandlung mit *Blastomycetes paraneoformans* ein, und zwar machte ich dabei die Einspritzungen bei Kaninchen in die Adern, bei den Meerschweinchen aber unter die Bauchwand. Eine gewisse Anzahl der Kaninchen wie der Meerschweinchen wurde von der Behandlung ausgeschlossen, um als Kontrolle zu dienen. Die behandelten Tiere blieben alle am Leben, die Kontrolltiere hingegen erlagen einer diffusen Blastomyceteninfektion.

Um sich zu überzeugen, ob die *Blastomycetes paraneoformans* das Vermögen besäßen, auch jene Ratten zu retten, bei denen sich das Sarkom bereits in der Bauchhöhle entwickelt hatte, impfte ich bei vielen Ratten kleine Sarkomfragmente, die aus kurz zuvor getöteten Ratten entnommen waren, in die Bauchhöhle ein. Jede einzelne Tierreihe wurde dabei in 2 gleich große Gruppen geteilt und die Tiere der 1. Gruppe, vom 10. Tage nach der Transplantation angefangen, intraperitoneal mit *Blastomycetes paraneoformans* eingespritzt, während die der 2. Gruppe als Kontrolle verwendet wurden und daher unbehandelt blieben. Während nun bei dieser 2. Gruppe der Tod einiger Tiere zu verzeichnen war, mit Bestehen eines auf das Omentum und die Lungen

ausgebreiteten Sarkoms, ist in der anderen, 1. Gruppe keine einzige Ratte verendet. Da dieser Versuch in zahlreichen Serien und stets mit dem gleichen Resultat ausgeführt worden ist, so besteht kein Zweifel mehr über den Wert der Behandlung mit *Blastomycetes paraneoformans* beim Rattensarkom.

Auf Grund der erhaltenen Ergebnisse schien es nunmehr angezeigt, zu verfolgen, ob diese *Blastomycetes paraneoformans* auch auf die bösartigen Geschwülste des Menschen einwirken können. Ich habe deshalb den Impfstoff schon vor längerer Zeit an hervorragende Chirurgen geschickt, mit der Bitte, denselben auszuprüfen, und zwar besser bei äußeren als bei inneren Tumoren, da man bei solchen Fällen genauer über den Beginn unterrichtet ist und deutlicher die Veränderungen verfolgen kann, welche die Geschwülste unter der Einwirkung der spezifischen Behandlung erleiden. Ich habe empfohlen, zum Versuch nicht zu alte Fälle zu wählen, da bekanntlich die biologischen Heilmittel umso besser wirken, je früher sie zur Anwendung gelangt sind. Ferner habe ich den Wunsch geäußert, es möchten ausschließlich Fälle gewählt werden, bei denen die Diagnose auf Tumor mikroskopisch bestätigt wurde, mit Ausschluß von ulzerierten Geschwülsten, bei denen stets eine Infektionsgefahr und die Möglichkeit einer Hämorrhagie vorliegt. Schließlich empfahl ich auch, die Behandlung nicht einzuleiten, falls der Allgemeinzustand des Patienten kein günstiger war.

Zum Beweise, daß diese Behandlung auch bei bösartigen Geschwülsten des Menschen erfolgreich sein kann, berichte ich hier in Kürze über 2 Fälle: die ausführliche Beschreibung des ersteren wird Dr. Giuseppe Colombo, Assistent der von Prof. Borghi geleiteten hiesigen Augenklinik, publizieren; über den 2. Fall wird Dr. Dante Gaiani, früher Assistent am hiesigen Hygienischen Institut und nunmehr praktischer Arzt, näheres berichten.

Was den 1. Falle betrifft, so handelte es sich dabei um ein parvzelluläres Sarkom des Tränensackes bei einem Knaben. Es sei noch bemerkt, daß in der Literatur nur ganz wenige Fälle von Sarkomen des Tränensackes verzeichnet sind, und daß sämtliche in verhältnismäßig kurzer Zeit zum Tode führten. Der Tumor wurde abgetragen, mikroskopisch untersucht und hierauf die Diagnose gestellt. Kurze Zeit nach Abtragung des primitiven Tumors trat eine Metastase am Hals auf, die ebenfalls abgetragen und mikroskopisch untersucht wurde. Die histologische Prüfung bestätigte, daß es sich um ein parvzelluläres Sarkom oder Rundzellensarkom handelte. In Anbetracht des raschen Auftretens der Metastase, wurde beschlossen, den Patienten mit der von mir hergestellten antineoplastischen Vakzine zu behandeln. Ein Jahr ist verflossen, seit die Behandlung des Knaben beendet wurde, und es ist seitdem zu keiner Neubildung der Geschwulst gekommen. Es ist absolut ausgeschlossen, daß es sich in diesem Falle um eine Infektionsgeschwulst gehandelt habe, d. h. um eine Art pseudoleukämischer Geschwulst, die sich durch reichen Gehalt an Plasmazellen kennzeichnet und deshalb auch mit dem Namen Plasmon bezeichnet wird. Derartige Tumore unterscheiden sich bekanntlich von den echten Sarkomen, weil sie mit Vorliebe auf die naheliegenden Gewebe übergreifen, ohne dieselben zu zerstören.

Beim 2. Falle handelte es sich um ein Riesenzellensarkom des Oberkieferknochens bei einer 32jährigen Frau. Da zwischen einer im Zahnfleisch entstehenden Neoplasie und einer Neubildung mit Ursprung im Periost oder im Knochen kein deutlicher Unterschied besteht, so begreift man unter dem Namen Epulis alle Geschwülste nicht entzündlicher Natur, die vom Alveolarrand der Zähne ausgehen: man unterscheidet dabei Epulis von fibröser, knochiger, karzinomatöser oder sarkomatöser Natur. Ziemlich häufig kommen die aus Riesenzellen bestehenden sarkomatösen Zahnfleischgeschwülste vor. In dem

zur Beobachtung gelangten Fall hatte die Neoplasie das Aussehen eines kleinen Hahnenkamms. Da die Geschwulst die Patienten namentlich beim Essen störte und häufig Blutungen veranlaßte, so beschloß man, sie abzutragen. Auf Grund der angeführten histologischen Prüfung konnte die Diagnose auf sarkomatöse Riesenzelleneupulis oder Riesenzellensarkom des Zahnfleisches gestellt werden. Wenige Monate nach der Asportation der Geschwulst trat in situ ein Rezidiv auf.

Da sich die neue Geschwulst ziemlich rasch entwickelte, so beschloß man, ohne Zögern eine spezifische Behandlung einzuleiten: 1 Monat und etliche Tage nach Beginn der Einspritzungen zeigte sich der Umfang des Tumors schon stark reduziert, und nach 2 Monaten war die Geschwulst ganz verschwunden. Seit der Behandlung sind nunmehr bereits mehr als 4 Jahre verflossen, ohne daß ein neues Rezidiv zum Vorschein gekommen wäre.

III.

Aus dem vorausgehendem läßt sich schließen:

1) In der Außenwelt kommen Blastomyzeten vor, welche vom morphologischen und kulturellen Standpunkt aus mit den *Blastomyces neoformans* identisch sind, die aber kein pathogenes Vermögen besitzen. — 2) Diese *Blastomyces paraneoformans* sind imstande, die Versuchstiere gegen die Einimpfung pathogener Blastomyzeten zu immunisieren und die von einer Blastomyzeteninfektion bereits befallenen Tiere zu heilen. — 3) Werden solche *Blastomyces paraneoformans* vorbeugend bei Ratten eingeführt, so verhüten sie das Wachstum eines Sarkoms in der Bauchhöhle; werden sie bei Ratten eingespritzt, in denen das Sarkom schon entwickelt ist, so rettet die Behandlung diese Tiere vom Tode. — 4) Gleich günstige Resultate sind mit dieser Paraneoformans- oder antiplastischen Vakzine bei Menschen zu erzielen, die an bösartigen Geschwülsten leiden.

Modena, am 29. April 1928.

Literatur.

Sanfelice, Ueber die Immunität gegen die Blastomyzeten. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 96.) — Forgeot, Essais de traitement de la lymphangite epizootique par les cultures chauffées des cryptocoques. (Bull. Soc. Méd. Vét. 1920.) — Boquet et Nègre, Sur la vaccination thérapeutique de la lymphangite epizootique. (Bull. Soc. Méd. Vét. 1921.) — Larieux, Contribution à l'étude du traitement de la lymphangite epizootique. (Bull. Soc. Méd. Vét. 1922.) — Jaubert et Goy, Affections à levures traitée et guérie par la vaccinotherapie. (Compt. Rend. Soc. Biol. 1923.) — Bardelli, Ricerche sulla linfangite criptococcica. (Annali d'Igiene. 1926.) — Taillens, Morte per meningite tuberculare di un bambino vaccinato col B. C. G. (Rev. Méd. de la Suisse Romande. 1927.) — Sanfelice, Bacilli della tubercolosi e bacilli acido-resistenti. (Boll. Ist. Sierot. Mil. 1920.) — Ders., Intorno alla trasformazione dei bacilli acido-resistenti in bacilli della tubercolosi nell'organismo animale. (Annali d'Igiene. 1921.) — Ders., Vaccinazione e vaccinoterapia paratuberculare. (Riforma medica. 1926.) — Ders., Sulla trasmissibilità e la filtrabilità di un sarcoma del ratto prodotto con le inoculazioni dei blastomiceti patogeni. (Boll. Ist. Sierot. Mil. 1927.)

Nachdruck verboten.

Diplogaster lirata (Schneider, 1866) Oerley, 1885, ein freilebender Nematode im Urin eines Mannes.

[Aus dem Tierseucheninstitut der Universität Leipzig
(Direktor: Prof. Dr. A. Eber).]

Von Privatdozent Dr. C. Sprehn, Leipzig.

Mit 2 Abbildungen im Text.

A. Material.

Vom Zoologischen Museum der Universität Berlin, dem ich hiermit meinen besten Dank dafür ausspreche, erhielt ich einige Präparate mit Nematoden, die von Herrn Prof. Rosin, Berlin, dem Museum zur Bestimmung zugegangen waren. Die Würmer waren von einem an Harnröhrentzündung erkrankten Mann mit dem Urin ausgeschieden. Eine zufällige Verunreinigung des Urins mit freilebenden Nematoden kommt, wie mir Prof. Rosin gelegentlich einer Rücksprache ausdrücklich betonte, nicht in Frage.

B. Kurze Literaturübersicht über Funde „freilebender Nematoden“ im Harn des Menschen.

Scheiber, S. H. (1880) fand in Stuhlweißenburg im sauren, Eiweiß, Eiter und Blut enthaltenden Urin einer Frau, die an Pylonephritis, Pneumonie und akutem Darmkatarrh litt, den Nematoden: *Rhabditis pellio* (Schneider, 1866). Wie der Beobachter festgestellt hat, lebten die Würmer in der Vagina.

Oerley, L. (1886) bringt diese Würmer mit *Anguillula mucronata* Grube, 1849, in Beziehung, deren Jugendform in Regenwürmern leben soll. Ihm gelang es auch, die in Frage stehenden Würmer in der Vagina von Mäusen zur Ansiedlung und Vermehrung zu bringen, und er bestätigte nochmals die schon früher ausgesprochene Ansicht, daß diese Nematoden im Harn selbst nicht leben können.

Blanchard (1916) ist der Meinung, daß diese Nematoden durch Waschungen oder Umschläge, die ja oft angewendet werden, in die Nähe der Vulva gelangt und von da in die Scheide eingedrungen sind. Hier haben sie sich dann, da sie reichlich Nahrung fanden, auch reichlich vermehrt.

Condorelli-Francaviglia, M. (1918) fand dann ebenfalls Nematoden im Harn, und zwar diesmal bei einem Manne, einem Nephritiker. Er bestimmte sie ebenfalls als *Rhabditis pellio*.

Stiles, C. W., und Frankland, W. A. (1902) beobachteten *Anguillula aceti* (Müller, 1783) längere Zeit im Urin einer Frau. Die hysterische Patientin litt an chronischer Nephritis, der Harn reagierte sauer und hatte oft einen ausgesprochenen Geruch nach Essig. Es wird in diesem Fall angenommen, daß die Patientin Vaginalduschen mit verdünntem Essig angewandt hat, sei es um ihren Arzt zu täuschen oder sich vor Konzeption zu schützen. Mit diesen Duschen hat sie den im Essig lebenden Wurm in die Vagina gebracht.

Boston, L. N. (1907) und Napoleon (1907) melden ebenfalls Fälle, in denen sie *Anguillula aceti* im Urin beobachtet haben.

Baginsky (1887), Peiper und Westphal (1888) und einige andere Autoren berichten über das Auftreten von Nematoden im menschlichen Harn meist unter gleichzeitiger Hämoglobinurie. Die Würmer selbst sind in diesen Fällen nicht näher beschrieben.

C. Diagnose der bisher im Urin des Menschen beobachteten „freilebenden“ Nematoden.

a) *Rhabditis pellio* (Schneider, 1866).

Zu den Rhabditinae gehörige Nematoden mit prismatischer, röhrenförmiger, kontinuierlich chitinisierter Mundhöhle. Oesophagus mit einem vorderen Bulbus und einem klappentragenden Endbulbus. Die Kutikula ist glatt, ♂ bis 2 mm lang, mit deutlichen Kaudalflügeln, 9 Papillenpaaren, von denen 2 oder 3 präanal liegen, und 2 Spicula. Das Körper-

hinterende schließt mit einem kurzen Schwanz ab, der die Kaudalflügel kaum überragt. ♀ bis 3 mm lang. Der hier etwas längere Schwanz trägt in oder hinter seiner Mitte 2 linsenförmige Papillen. Vulva in der Körpermitte stark hervortretend.

$$\alpha = \text{relative Körperbreite} = \frac{\text{Gesamtkörperlänge}}{\text{größte Körperbreite}} = 15.$$

$$\beta = \text{relative Oesophaguslänge} = \frac{\text{Gesamtkörperlänge}}{\text{Oesophaguslänge}} = 9.$$

$$\gamma = \text{relative Schwanzlänge} = \frac{\text{Gesamtlänge}}{\text{Schwanzlänge}} = \frac{\text{♀ } 13}{\text{♂ } 32'}$$

Die Würmer sind saprob., Jugendstadien wahrscheinlich in Regenwürmern (?).

b) *Anguillula aceti* (Müller, 1786).

Zu den Agnathulidae gehörig. In der kleinen Mundhöhle befinden sich ein kleiner dorsaler und 2 größere spitze subventrale Zähne. Der vordere Teil der Mundhöhle ist kurz prismatisch, der hintere, etwas länger, trichterförmig. Schwanz bei beiden Geschlechtern recht lang, beim ♂ etwas kürzer als beim ♀.

♂ 1,5—1,8 mm lang, ohne Kaudalflügel mit 5 Paar Papillen, Spicula von $\frac{1}{5}$ — $\frac{1}{6}$ Schwanzlänge.

$$\alpha = 40\text{--}60; \beta = 5\text{--}10; \gamma = 6\text{--}8,5$$

♀ 1,7—2,4 mm lang. Vulva etwas hinter der Körpermitte.

$$\alpha = 35\text{--}55; \beta = 5,4\text{--}8; \gamma = 4,8\text{--}7,6.$$

Die Würmer leben im Essig und im sauren Kleister. Eine kleinere Form ist aus dem weißen Schleimfluß der Eichen unter dem Namen *A. aceti* var. *dryophila* (Leuckart, 1887) bekannt.

D. Beschreibung und systematische Stellung der vorliegenden Würmer.

Die vorliegenden Würmer haben eine langgestreckte Gestalt und sind nach vorne wenig, nach hinten stark verjüngt. Sie tragen in beiden Geschlechtern einen langen fadenförmigen Schwanzanhang, der

peitschenähnlich ganz spitz ausläuft und beim ♂ in der Regel noch etwas länger als beim ♀ ist. Die Cuticula ist borstenlos und seitlich längsgestreift.

Seitenorgane sind nicht nachzuweisen. Das Vorderende ist nicht abgesetzt und deutlich abgestutzt. Lippen sind nicht nachzuweisen, ebenfalls keine Kopfpapillen oder Borsten. In der zylindrischen, 0,012 mm tiefen Mundhöhle sind kleine zahnartige Bildungen zu beobachten. Der Oesophagus ist 0,096 mm lang und zeigt einen deutlichen, mehr oder weniger vorderen muskulösen Bulbus und einen schwach ausgebildeten hinteren. Ein Exkretionsporus war nicht nachzuweisen.

♂ 0,46—0,50 mm lang und 0,02—0,024 mm breit. Das proximale erste Schwanzdrittel verjüngt sich allmählich kegelförmig, die letzten distalen Zweidrittel sind fadenförmig dünn, plötzlich abgesetzt und sehr spitz auslaufend. Der Schwanz hat eine Länge von ca. 0,08 mm, Kaudalflügel fehlen. Postanal



Fig. 1. *Diplogaster lirata* (Schneider, 1866) ♂, Schwanzende. 1 Teilstrich = 0,01 mm.

Der Oesophagus ist 0,096 mm lang und zeigt einen deutlichen, mehr oder weniger vorderen muskulösen Bulbus und einen schwach ausgebildeten hinteren. Ein Exkretionsporus war nicht nachzuweisen.

♂ 0,46—0,50 mm lang und 0,02—0,024 mm breit. Das proximale erste Schwanzdrittel verjüngt sich allmählich kegelförmig, die letzten distalen Zweidrittel sind fadenförmig dünn, plötzlich abgesetzt und sehr spitz auslaufend. Der Schwanz hat eine Länge von ca. 0,08 mm, Kaudalflügel fehlen. Postanal

liegen 3 Paar sehr kleine Papillen, präanal ebenfalls 3 Paar, nicht weit vor der Kloake. Es sind zwei fast gleichgroße ca. 0,021 mm lange und kräftig gebogene Spicula vorhanden, außerdem ein kleines und wenig auffallendes Gubernaculum.

$\alpha = 19-25$; $\beta = 5$; $\gamma = 5,8-6,3$.

♀ 0,48—0,51 mm lang und 0,016—0,024 mm breit. Das Hinterende geht ganz allmählich in den ca. 0,14 mm langen Schwanz über, der ebenfalls in eine äußerst feine Spitze ausläuft. Die Ovarien liegen offenbar symmetrisch zu beiden

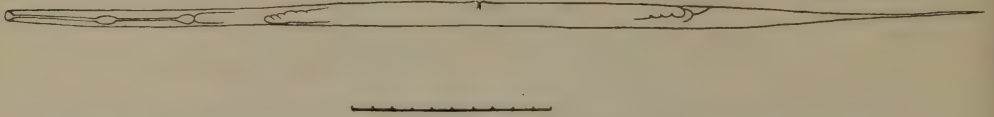


Fig. 2. *Diplogaster lirata* (Schneider, 1866) ♀. 1 Teilstrich = 0,01 mm.

Seiten der Vulva. Diese liegt nahe der Körpermitte, in der Regel etwas vor ihr, bei einigen Exemplaren aber auch hinter der Mitte, und hat nur ganz schwach gewulstete, nicht hervortretende Lippen. Eier waren nicht nachzuweisen.

$\alpha = 20-32$; $\beta = 5$; $\gamma = 3,4-3,6$.

Es ist hierzu zu bemerken, daß mir zu der Bestimmung nur die fertigen, zum Teil gefärbten, zum Teil ungefärbten Balsampräparate zur Verfügung standen, daß also die angegebenen absoluten Maße und auch die Verhältniszahlen nur mit einer gewissen Reserve gegeben werden können.

Aus der soeben gegebenen Beschreibung der gefundenen Würmer ergibt sich ohne weiteres, daß die bekannten parasitischen Nematoden des Menschen differentialdiagnostisch ausgeschlossen werden können. Von den beim Menschen schon gelegentlich gefundenen beiden oben beschriebenen freilebenden Nematoden ist dasselbe zu sagen. Es handelt sich vielmehr in den Präparaten um Männchen, Weibchen und Larven eines zur Familie der Odontopharyngidae gehörigen Nematoden, der die Charaktere der Unterfamilie der *Diplogasterinae* aufweist und ins Genus **Diplogaster** M. Schultze, 1857 zu stellen ist, und zwar um

Diplogaster lirata (Schneider, 1866) Oerley, 1885.

Der Wurm ist 1866 zuerst von Schneider unter dem Namen *Leptodera lirata* beschrieben und diese Diagnose 1885 von Oerley erweitert, der ihn auch zum Genus *Diplogaster* stellt. Er gibt eine recht brauchbare Beschreibung der Art, die sich in fast allen wesentlichen Punkten mit der oben gegebenen deckt, nur ist nach Oerley bzw. Schneider der Wurm ganz erheblich breiter (0,031 mm gegenüber 0,016—0,024 mm in unserem Fall). Ob die von mir gemessene geringere Dicke an der Art der Präparation der Würmer liegt, muß dahingestellt bleiben, jedenfalls muß der Wurm, da die Diagnosen sich in allen anderen wesentlichen Punkten decken, trotzdem zu derselben Art gestellt werden. Die etwas abweichende Schwanzlänge ist ohne Bedeutung, außerdem handelt es sich bei unseren Präparaten gerade bei dieser Maßzahl um nur an einigen wenigen Exemplaren überhaupt zu ermittelnde Größen (2 ♀; 3 ♂).

Die Diagnose nach Oerley für den Wurm, wie sie auch Micoletzky (1921) aufgenommen hat, wäre, soweit sie die obigen Angaben ergänzt oder von ihnen abweicht, folgende: Cuticula mit 15—20 Längsteilen. Mund mit 3 kaum hervorragenden Lippen; Mundhöhle besitzt 3 vorn leistenförmige, hinten zahnartige Chitinverdickungen. Uterus sehr klein, nur 1—2 Eier enthaltend. Vaginaldrüsen mächtig entwickelt.

Maße: Länge ♂ 0,5; ♀ 0,55 mm.
 Breite 0,031 mm, also $\alpha = 16-18$.
 $\beta = 5$; $\gamma \text{ ♂} = 7$; $\gamma \text{ ♀} = 4$.

Der Wurm wurde von Oerley in großer Anzahl im Bergwerk zu Chemnitz zwischen faulenden Pilzen gefunden und auch aus Erdproben derselben Gegend gezüchtet.

Zusammenfassung.

Im Urin eines an Harnröhrenentzündung erkrankten Mannes wurden kleine Nematoden gefunden, die als *Diplogaster lirata* (Schneider, 1866) Oerley, 1885 (Schneider, 1866) Oerley, 1885 bestimmt wurden.

Literatur.

Baginsky, Dtsch. med. Wochenschr. 1887. S. 604. — Blanchard, Bull. Soc. de Pathol. exot. T. 9. 1916. p. 515. — Boston, L. N., Journ. of Americ. med. Assoc. Vol. 48. p. 693. — Braun-Seifert, Die tierischen Parasiten des Menschen. 6. Aufl. Leipzig. 1925. — Condorelli-Francaviglia, M., Policlinico. Sez. Pract. 1918. No. 17. — Looss, A., Records of the School of Med., Ministry of education, Egypt. Vol. 4. 1911. p. 163—613. — Micoletzky, H., Arch. f. Naturgesch. Bd. 87. 1921. H. 8/9. S. 1—649. — Napoleon, Journ. of Americ. med. Assoc. Vol. 8. 1907. — Oerley, L., Matematikai és természettudományi Közlemények. Budapest 1885. — Ders., Die Rhabditiden und ihre medizinische Bedeutung. Berlin 1886. — Peiper u. Westphal, Centralbl. f. klin. Med. Bd. 9. 1888. S. 145. — Scheiber, S. H., Arch. f. patholog. Anat. u. Physiol. Bd. 82. 1880. S. 161—175. — Schneider, A., Monographie der Nematoden. Berlin 1866. — Stiles, Ch. W., u. Frankland, W. A., N. S. Dep. agric. Bur. anim. industry. Bull. No. 35. 1902.

Nachdruck verboten.

Ueber Farbstoffwirkung auf Bakterien.

III. Mitteilung.

[Aus dem Hygienischen Institut der Westfälischen Wilhelms-Universität zu Münster i. W. (Direktor: Prof. Dr. K. W. Jötten).]

Von Privatdozent Dr. med. **Fr. Sartorius.**

Mit 1 Abbildung im Text.

Wirkung von Farbstoffgemischen.

Die folgenden Ausführungen beschäftigen sich zunächst mit der Frage, wie Farbstoffmischungen auf Bakterien wirken, ferner mit einigen besonderen Einflüssen auf die Farbstoffwirkung.

Frei (1) wies in seinen Versuchen über Kombination von Desinfektionsmitteln darauf hin, daß nicht nur das Mischungsverhältnis 1:1, sondern auch andere Mischungsverhältnisse berücksichtigt werden müßten, weil sich die wechselseitige Beeinflussung der Komponenten nach physikalischen und chemischen Gesichtspunkten dabei ganz verschieden gestalten könne. Denken wir uns z. B., daß basische und saure Farbstoffe zusammen angewendet werden, so könnte schon durch kleinere Mengen des sauren die Wirkungskraft des basischen durch Vergrößerung resp. Flockung relativ stark vermindert werden. Wenn wir aber andererseits 2 basische Farbstoffe von verschiedenem Wirkungs-

charakter vor uns haben, so braucht es, selbst wenn sie sich physikalisch oder chemisch nicht beeinflussen, durch die Verschiedenheit ihrer Affinität oder Permeabilität selbst bei einem Verhältnis 1 : 1 nicht zu einem reinen Mischtyp zu kommen. Weiterhin aber könnte schon eine relativ kleinere Menge eines Farbstoffs, der in der Bakterienzelle elektive Rezeptoren besitzt, die Allgemeinwirkung des andern in relativ größerem Maße verstärken. Durch chemische oder physikalische Aenderung bei Mischung basischer Farbstoffe würden sich die Verhältnisse rein theoretisch noch komplizierter gestalten können.

Wir wollten hier zunächst sehen, was sich rein praktisch bei einer Reihe von Mischungen ergab, da nur sehr wenig Material in dieser Beziehung vorliegt. Churchman (2) führte in einem Falle an, daß ein Gemisch von Gentianaviolett und Akriflavin eine stärkere Additionswirkung entfaltete als ein Farbstoff allein. Römer, Gebb und Löhlein (3), Hoffmann (4) gingen in der Annahme, daß die elektiven Einzelwirkungen der Farbstoffe in Gemischen erhalten blieben, schon zu Versuchen über, Farbstoffgemische therapeutisch anzuwenden.

Wir suchten zunächst in einfachen Plattenversuchen über die Mischwirkungen von je zwei Farbstoffen Klarheit zu gewinnen, und zwar wurden in den folgenden Versuchen jeweils 3 resp. 5 Mischungsverhältnisse je zweier Farbstoffe hergestellt, und zwar

- 1) 4:0 reine Wirkung der einen Komponente, also z. B. 1 cem 2proz. Dahliälösung,
- 2) 3:1 = 0,75 2proz. Dahliälösung + 0,25 der 2. Komponente z. B. 2proz. Pyroninlösung,
- 3) 2:2 = 0,5 Dahlia + 0,5 Pyronin,
- 4) 1:3 = 0,25 Dahlia + 0,75 Pyronin,
- 5) 0:4 = 0 Dahlia + 1,00 cem Pyronin.

Gleichzeitig sollten aber auch die wichtigsten p_H -Stufen 6,5, 7,5, 8,5 mit berücksichtigt werden und so wurden dann diese Mischverhältnisse 1—5

- | | | |
|----|-------------------|-----------|
| a) | zu je 20 cem Agar | p_H 6,5 |
| b) | " " | p_H 7,5 |
| c) | " " | p_H 8,5 |

Es entstanden auf diese Weise je 5 Platten mit den Mischverhältnissen eines Farbstoffpaares bei p_H 6,5, je 5 Platten bei 7,5 und je 5 bei 8,5, insgesamt 15 Platten für 1 Farbstoffpaar. Jede Platte wurde strichweise mit je einer Oese Aufschwemmung verschiedener 24stünd. Bakterienschrägagarkulturen beimpft (meist 6—8 Stämme der Ty-Coli-Gruppe). Die jeweils zusammengehörigen Wirkungen auf jeden Stamm in der a—c Reihe wurden für die Betrachtung rechnerisch summiert, ähnlich wie das in der ersten Mitteilung für die Bewertung der Wirkung beschrieben wurde. Es wurde auf diese Weise angestrebt, 1) das Besondere der p_H -Stufenwirkung zu verwischen, 2) technische Fehler (Beimpfung usw.) durch die 3malige Anwendung jeder Farbstoffmischung (wenn auch in verschiedener p_H -Stufe) zu mildern. Bei den Mischungsverhältnissen 1 und 5 mußten die in der 2. Mitteilung mitgeteilten charakteristischen Wirkungsverhältnisse der reinen Farbstoffe auf die Hauptmitglieder der Coli-Typhusgruppe (Coli-Paratyphus A, Paratyphus B, Typhus) zustande kommen, und zwar entweder sogenannte physiologische Typen, bei denen Coli und Paratyphus B resistenter sind als Paratyphus A und Typhus oder Elektivtypen, bei denen entweder die Paratyphen allein oder mit Typhus zusammen resistenter sind als Coli. Nach der Art der Berechnung konnte nur dadurch eine Abweichung hierin auftreten, daß die p_H -Stufen stark abweichende Wirkungstypen verursachten, was ja bei einzelnen Farbstoffen der Fall ist. Wir müssen hier leider auf eine ausführliche Wiedergabe der Ergebnisse in Tabellenform verzichten und können nur einige Einzelheiten schematisch wiedergeben.

Bei der ersten Versuchsreihe wurde Methylengrün als ständige Grundkomponente mit verschiedenen anderen Farbstoffen gemischt (Rhodulingelb T, Auramin, Neublau D). Geprüft wurden die Wirkungen an 8 Stämmen (je 2 Coli, Paraty A, B und Typhus). Es zeigte sich deutlich in allen Fällen ein allmählicher Uebergang von der Wirkungsstärke des Methylengrüns zu der Wirkungsstärke und dem Wirkungstyp der zugemischten Farbstoffmarken (siehe Tabelle I, Mischung von Methylengrün und Rhodulingelb T). Auffällig war nur, daß bei Rhodulingelb durch den kleinen Zusatz Methylengrün die Wirkung auf Coli und Paratyphus A schon relativ zu stark zunahm, während umgekehrt die starke reine Methylengrünwirkung auf Paratyphus B schon durch kleine Rhodulingelbzusätze relativ zu stark abnahm (Tab. I).

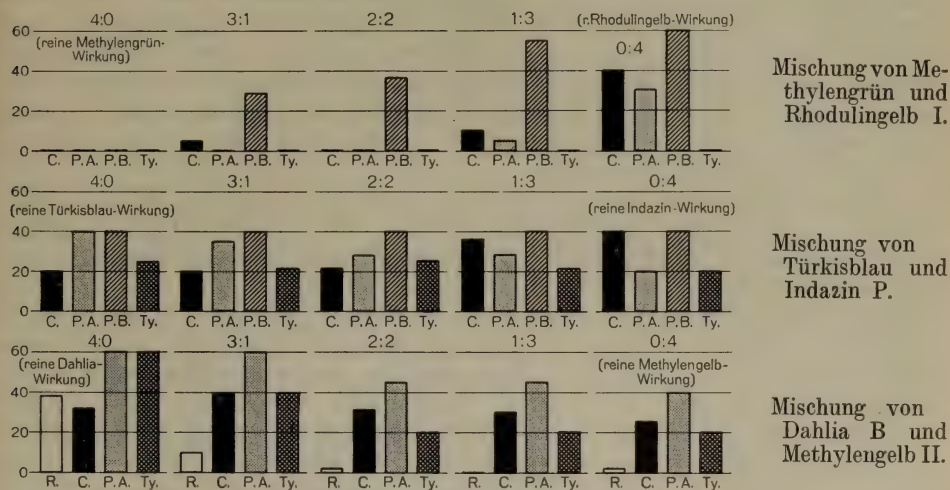


Tabelle I (Fig. 1). Wirkung von Farbstoffgemischen (schematisierte Wiedergabe bei den einzelnen Mischverhältnissen).

Bezeichnungen: C. = Coli Bezeichnungen: Ty. = Typhus
 „ P.A. = Paratyphus A „ R. = Pseudoruhr.
 „ P.B. = „ B

In der nächsten Versuchsreihe war Amethystviolett als Grundkomponente mit verschiedenen anderen Farbstoffen (Methylgrün, Aethylviolett, Indulinscharlach, Capriblau) vermisch. Die Beimpfung war die gleiche wie bei der vorigen Serie.

Die Mischung mit den 3 ersten Farbstoffen (Methylgrün, Aethylviolett, Indulinscharlach) zeigte keine elektiven Verstärkungen der Wirkungen durch die Mischung, sondern wieder nur den allmählichen Uebergang von einer Wirkungsstärke zur andern. Eine Ausnahme machte nur die Verbindung mit Capriblau; hier kam es beim Mischungsverhältnis 2:2 zu einer unerwarteten Verstärkung der Gesamtwirkung.

Kombinierte man die mit recht verschiedenen Wirkungstypen versehenen Marken Türkisblau und Indazin P, so konnte man die Veränderung des Wirkungscharakters sehr gut durch die verschiedenen Mischungen hindurch verfolgen. Eine allgemeine Wirkungssteigerung durch die Kombination ergab sich nicht (s. Tabelle D). Weiterhin wurden dann noch Versuchsreihen angestellt mit Dahlia resp. Methylenviolett 2 K A als Grundkomponenten und Acridinorange, Pyronin, Diazingrün, Janusgrün, Methylengelb, Tanninheliotrop, Aurantia, Cyanosin, Resorzinschwarz resp. Neu-

methylenblau BB, Neutralblau und Thioninblau, Neutralviolett und Kristallviolett als Mischkomponenten.

Es ergab sich dabei nichts wesentlich Neues als bei den vorigen Kombinationen (s. Tab. I Dahlia + Methylengelb). Bei manchen Kombinationen (Dahlia + Safranin, Dahlia + Acridinorange) hatte es den Anschein, als ob einzelne Stämme durch bestimmte Mischungsverhältnisse besonders stark beeinflusst würden, wenn auch sonst wie erwähnt, im allgemeinen nur ein Uebergang von einem zum anderen Wirkungstyp resp. zur anderen Wirkungsstärke zu sehen war. Bei einigen anderen Kombinationen (Dahlia + Aurantia, Dahlia + Cyanosin, Methylviolett + Neutralviolett mehr das umgekehrte der Fall. Einzelne Stämme wurden dem Mischungsverhältnis der Farbstoffe entsprechend zu gering beeinflusst (Methylviolett + Thioninblau, Methylviolett + Kristallviolett u. a.). Mehrmals begegneten wir noch der Erscheinung, daß der in den Mischungsverhältnissen 3 : 1 und 1 : 3 vorhandene kleine Prozent der einen Farbstoffkomponente die Wirkung der stärkeren Komponente relativ zu stark veränderte (vermehrte oder verminderte), während das Verhältnis 2 : 2 vielfach eine leichte Verstärkung der Allgemeinwirkung auf alle Stämme deutlich machte.

Fassen wir unsere Ergebnisse kurz zusammen, so müssen wir zur Ueberzeugung kommen, daß die Mischwirkung von Farbstoffen im großen und ganzen als eine Additionswirkung angesehen werden muß. Das Wirkungsbild verschiebt sich je nach der überwiegenden Konzentration von der Stärke und dem Typ der einen Komponente zu der Stärke und dem Typ der anderen. In seltenen Fällen scheint bei einem Mischungsverhältnis 2 : 2 eine relative Gesamtverstärkung möglich. Eigenartig für bestimmte Mischungen ist die Tatsache, daß kleinere Zusätze einer Komponente zu größeren einer anderen für manche Bakterienstämme resp. Arten eine relativ zu starke Schwächung resp. Stärkung der Wirkung ergeben können. In manchen Kombinationen läßt sich bei verschiedenen Mischungsverhältnissen ein Wirkungsoptimum oder Minimum für einzelne Stämme erkennen. Von Wert scheint bei der Kombination die Möglichkeit der Verbesserung eines Wirkungscharakters für praktisch diagnostische Zwecke.

Diese letztere Vermutung hat sich in weiteren Kombinationsversuchen mit Typhus- und Paratyphuselektiven Farbstoffen bestätigen lassen (Veröffentlichung erscheint in Ztschr. f. Hyg.).

Hier möchte ich noch im gleichen Sinne darauf hinweisen, daß sich eine Verbesserung der Elektivwirkungen wahrscheinlich auch recht gut durch bestimmte Satzzusätze erreichen läßt. Nach den früher mitgeteilten Befunden über die Wirkung von Neutralsalzzusätzen zum Nährboden auf die Typhus-Coli-Gruppe konnten wir z. B. im Lithiumchlorid ein Salz mit elektiven Eigenschaften vermuten. Es wurde zur Probe folgender Versuch gemacht.

Es wurden 4mal 20 ccm Agar, pH 7,5 mit 0,3 g Lithiumchlorid versetzt. Darauf kam zu je einer Portion 1 ccm 2proz. Dahliälösung, 1 ccm Methylengelb H, 1 ccm Trypaflavin 2proz. Die 4. Portion blieb als Kontrolle ohne Farbstoffzusatz. Außerdem liefen 3 Farbstoffkontrollen ohne Salzzusatz. Die in dieser Weise vorbereiteten Agarportionen wurden zu je einer Platte verarbeitet und mit je 2 Vertretern der Typhus-Coli-Gruppe, ferner je 1 Cholera- und Ruhrstamm beimpft. Die Ergebnisse waren folgende (siehe Tab. S. 317 oben).

Es ergab sich also eine Verbesserung der Elektivwirkung. Der eine Coli-Stamm, der in den reinen Farbstoffkontrollen noch leichteres Wachstum gezeigt hatte, blieb bei Lithiumzusatz gehemmt.

Ferner wurde in diesem Zusammenhang noch geprüft, ob z. B. Stoffe wie Dextrin, das den Farbstoffen ja beigemischt sein kann, oder ein relativ hoher

Wirkung von:	Coli		Paraty. A		Paraty. B		Ty.		Chol.	Ruhr
1 cem Dahlia 2% auf 20 cem Agar	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—
1 cem Methylengelb 2% auf 20 cem Agar	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—
1 cem Trypaflarin 2% auf 20 cem Agar	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—
0,3 g Lithiumchlorid auf 20 cem Agar	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
Lithiumchlorid + Dahlia auf 20 cem Agar	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—
Lithiumchlorid + Methylengelb auf 20 cem Agar	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—
Lithiumchlorid + Trypaflavin auf 20 cem Agar	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—

Lezithingehalt des Nährbodens die Farbstoffwirkung abzuschwächen vermag. Eine Prüfung mit Echt-Baumwollblau B mit den gleichen Stämmen wie oben, ergab folgendes Bild:

Wirkung von	Coli		Paraty. A		Paraty. B		Ty.		Chol.	Ruhr
1 cem Echtbaumwollblau B 2% auf 20 cem Agar	+	±	—	—	+	—	—	—	—	—
1,5 cem Echtbaumwollblau B 2% auf 20 cem Agar	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1 cem Dextrin 20% auf 20 cem Agar	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1 cem Echtbaumwollblau + 1 cem Dextrin, 20% auf 20 cem Agar	—	+	—	—	+	—	—	—	—	—
1,5 cem Echtbaumwollblau + 1 cem Dextrin, 20% auf 20 cem Agar	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1 cem Echtbaumwollblau + 1 cem 20% Lezithin auf 20 cem Agar	±	+	—	+	+	—	±	—	—	—
1 cem Echtbaumwollblau + 1 cem 20% Lezithin auf 20 cem Agar	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—
1 cem 20% Lezithin auf 20 cem Agar	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

Also keine schwächende Wirkung des Dextrinzusatzes, nur leicht schwächende Wirkung bei ziemlich starkem Lezithinzusatz, wobei es sich aber weniger um Zurückhaltung des Farbstoffes als um wachstumbegünstigende Wirkung des Lezithins handelt.

Von Interesse erscheint es noch, im Anschluß an diese Versuche, auch Zusätze, wie Galle, gallensaure Salze, Sera, Aszites, Blut in ihrer Einwirkung auf die verschiedenen Farbstoffwirkungen im Nährboden eingehender zu studieren. Im Verlaufe dieser Untersuchungen mußte ich jedoch diese Fragen zurückstellen. Dagegen konnten noch einige bemerkenswerte Tatsachen zu der Frage beigetragen werden, inwieweit die so prägnanten Hemmungswirkungen der Farbstoffe mit der Abtötung der Keimarten übereinstimmen, insbesondere was das Verhältnis der grampositiven zu den gramnegativen Keimarten betrifft.

Abtötungsversuche.

a) mit Farbstoffen allein.

Wenn man sich nach früheren Ausführungen die Abtötung als eine langsam zur Irreversibilität gelangende „Entmischung“ (Fällung) der Protoplastenteile vorzustellen hat, so könnte diese Entmischung doch zeitlich bei den verschiedenen Keimarten verschieden schnell fortschreiten resp. die

Schädigung selbst bei völliger Hemmung von der einen länger ertragen werden als von der anderen. Infolgedessen würden eventuell die Abtötungszeiten nicht mit der Hemmung in Einklang stehen.

Der eigentliche Desinfektionswert der Farbstoffe ist noch in sehr geringem Maße in exakter Weise bearbeitet. Versuche mit Suspension von Bakterien in Farbstofflösungen und Oesenabimpfung nach bestimmter Zeit können nur wenig zur Klärung beitragen. Die Gefahr, entwicklungshemmende Substanzen in die Nachkultur oder nur schon zu stark geschädigte Keime zu übertragen, bedingt hier weitgehende Schwankungen. Einige Untersucher bedienten sich zur Feststellung der Desinfektionswirkung von Farbstoffen der Granatmethode (Wolf) (5) oder von Bakterien, die an Deckgläsern angetrocknet waren (Kriegler) (6). Letzterer fand dabei für Staphylokokken größtenteils geringere Abtötungszeiten als für die gramnegativen Keime. Doch liegt, wie sich Eisenberg (7) schon äußerte, eine nicht unwichtige Fehlerquelle bei diesen Versuchen in der verschiedenen Resistenzverminderung durch Antrocknung. Eine andere aber sehen wir darin, daß das Verhalten der getrockneten Keime zur Farbstoffaufnahme wechselnd verändert sein kann, ebenso in der Unsicherheit des Auswaschprozesses. Zunächst wurde nämlich auch versucht, an Granaten angetrocknete Coli- und Staphylokokken zu Farbstoffdesinfektionsversuchen zu verwenden. Durch den zur Entgiftung notwendigen 3—4maligen Waschprozeß wurden aber derart schwankende Verhältnisse geschaffen, daß von dieser Methodik Abstand genommen wurde.

So wurde schließlich eine etwas angepaßte Prüfung im Suspensionsversuch ausgearbeitet. Eine größere Keimmenge verlangen schon die Tatsachen der Absterbeordnung (Reichenbach u. a. (8)). Meine Keimmengen gingen aus praktischen Gesichtspunkten über sonst vorgeschlagene Masse hinaus, indem ich für 2 ccm einer 0,1proz. Farbstofflösung in einem Teil der Versuche 3 Tropfen (0,15 ccm) der Abschwemmung einer ganzen Agarkulturplatte von Staphylokokken oder Coli zur Einsaat brachte, in einem anderen Teil der Versuche sogar 5 Tropfen. Die Desinfektionslösungen waren damit durch den Bakterienzusatz ganz leicht getrübt, die Keimzahlen hielten sich, wie Zählplatten zeigten, hoch in den Milliarden, und zwar für 5 Tropfen um 500 Milliarden. Der Bakterienzusatz wurde deswegen so hoch und erschwrend für die Abtötung genommen, um auch für praktische Desinfektionszwecke einen Maßstab zu erhalten, was Farbstofflösungen zu leisten vermögen. Außerdem gingen durch den Waschprozeß ja auch noch Keime verloren.

Nach verschiedenen Einwirkungszeiten wurden die Bakterien aus der desinfizierenden Farbstofflösung ausgeschleudert und nach Abgießen der obenstehenden Farbstofflösung so lange mit 2,5proz. Traubenzuckerlösung gewaschen, bis praktisch keine Färbung der Waschflüssigkeit mehr eintrat. Als Waschflüssigkeit wurde Traubenzuckerlösung gewählt, um eine Ausflockung des noch bleibenden Restes der Farbstofflösung zu vermeiden und auch die Lebensfähigkeit möglichst nicht noch weiter zu beeinträchtigen. Handelte es sich um unwirksame Stoffe, so ging die Auswaschung relativ schnell vor sich, die Bakterien wurden zuletzt fast farblos. Bei den wirksamen Farbstoffen wurde die Färbung hartnäckig bis zur 5.—6. Waschung festgehalten, während die Waschflüssigkeit ebenfalls klar blieb.

Weiterhin wurden dann Verhältnisse optimaler Nachkultur dadurch geschaffen, daß der Bodensatz nach der letzten Waschung je zur Hälfte einmal auf eine 3proz. Zuckeragarplatte, zweitens in 3proz. Traubenzuckerbouillon eingesät wurden (Staphylokokken). Bei Coli 1proz. Traubenzuckerplatte und 1proz. Traubenzuckerbouillon. Das Wachstumsergebnis wurde dann nach 24—48 Std. Aufenthalt im Brutschrank beobachtet. Es wurden also recht hohe

Anforderungen an den Farbstoff gestellt, aber dafür auch die beobachtete Wirksamkeit von Zufallsmomenten befreit. Aus praktischen Gründen wurde zunächst die Abtötung in 24 Std. als Prüfungs- und Wirksamkeitsgrenze gesetzt. Farbstoffe, die sich innerhalb dieser Zeit wirksam erwiesen, wurden dann noch auf genauere Stundenzahl ausgewertet.

Die Prüfung erstreckte sich auf fast alle zur Verfügung stehenden Farbstoffe, und es erwies sich dabei, daß die Hauptmenge der Farbstoffe innerhalb 24 Std. in 0,1proz. Lösung keine Abtötung für Coli und Staphylokokken bewirken kann. Diese unwirksamen Farbstoffe sind in der Liste I hierzu nach Farbstoffklassen geordnet aufgeführt. Einzelne ließen nach dem nur geringen Wachstum auf den Platten wohl vermuten, daß die Abtötungszeit nahe hinter der 24 Stundengrenze liegen könnte, bei anderen handelte es sich wohl um einen Zufallbefund.

Liste I.

Farbstoffe, welche in 0,1proz. Lösung keine Abtötung innerhalb 24 Std. bewirken.

Einsaat: 5 Tr. einer dichten Aufschwemmung von Coli resp. Staphylokokken in 2 ccm 0,1proz. Farbstofflösung.

Azine: Magdalarot, Echtneutralviolett, Rosindulin 2 G, Flavindulin ON, Neutralviolett extr., Neutralrot, Rhodulinviolett, Tanninheliotrop, Indazin P, Methylenheliotrop O, Neutralblau, Nigrosin, Baslerblau K.

Oxazine: Capriblau G O, Gallozyanin D H, Neublau R, Neublau B, Neublau D, Brillantkresylblau, Echtbaumwollblau B, Nilblau Chlorhydrat, Gallaminblau G M, Kresylviolett.

Di und Triphenylmethane: Aethylgrün, Viktoriagrün, Cyanolgrün B, Auramin, Methylviolett B, Dahlia B, Säuregrün, Türkisblau, Reinblau, Opalblau, Wasserblau, Chinablau, Säurefuchsin, Brillantreinblau, Patentblau, Tetracyanol B, Anilinblau, Guineagrün, Chromgrün.

Xanthonfarbstoffe: Phloxin, Rosolscharlach G extra, Eosin, Uranin, Methyleosin, Erythrosin, Rosebengale, Cyanosin, (Coerulein 5), Irisamin, Rhodamin S, Rhodamin G, Rhodamin B, Pyronin, Fluorescein, (Thymolblau).

Acridinfarbstoffe: Trypaflavin, Phosphin, Canelle A. L. X. Acridinorange, Rhodulinorange N, Benzoflavin, Rheonin, Rivanol, Coriphosphine O, Sinflavin.

Chinoline: Chinolinrot, Chinolingelb, Homokol.

Nitrofarbstoffe: (Nitrophenol para, Nitrophenol meta), Martinsgelb, Naphtolgelb S, Aurantia, Naphtylamingelb 39.

Thiazine: Thionin, Neumethylenblau RRR, Methylengrün, Neumethylenblau BB, Thioninblau G, O, Eosin Methylenblau, Azur I, Azur II, Azur II Eosin.

Azofarbstoffe: Spritzgelb G, Chrysoidin A, Bismarkbraun, Azophosphin G O, Lederbraun?, Janusrot B, Janusgelb G, Janusbraun R, Janusbraun B, Janusgelb R, Janusgrün B, Janusgrün G, Diazingrün, Janusgrau B, Janusblau R, Resorcinbraun, Flavazin L, Tartrazin, Scharlach R, Benzopurpurin, Diaminrosa, Tanninorange R, Naphtaminschwarz H, Renolschwarz, Diaminblau BB, Diaminschwarz, Diamincatechu, Dianilblau R, Azowollblau, Dianilschwarz C R, Chromotrop, Chrysamin R, Toluylenbraun G, Brillanterocein, Thiazinrot, Methylorange, (Tropaeolin), Bordeauxrot, Orange G, Congo-Rubin, Trypanrot, Azofuchsin, Echtröt, Echthgelb, Metachromgelb, Rosazurin B, Azoblau, Metanilgelb, Brillantschwarz, Alkaligrün, Curcumin, Benzoazurin, Azoeosin, Naphthazurin, Neutoluylenblau, Naphtylblau B B, Naphtolblau G, (Naphtolblau R), Diphenylblau, Cochenillscharlach, Heliotrop B B, Chromotrop 6 B, Tolanrot B, Rosindulin S D T, Kresotingelb R, Hydrazingelb, Brillantsäurekarmin, Toluylenbraun R, Thiazolgelb G, Goldgelb, Dianilgelb 3 G, Dianilgelb R, Anthracengelb R N, Baumwollgelb R, Toluylenorange G, (Diazinblau B), Janusblau G, Orange III, Diazinschwarz.

Alizarine: Alizarinsaphirol B, Alizarinorange K, Alizarinbordeaux B, Alizarinrot W, Alizarin W RR, Alizarincyanin G extra, Alizarininisot B, Alizarinreinblau B, Alizarinzyanin-grün G extra, Alizarinzyanin R R, Alizarinzyanin W R B, Alizarinzyanin G G, Alizarinrot I extra, (Alizaringelb), Anthracenbraun R, Anthracenbraun B.

Sonstige: Corallin wasserl. Methylengelb H, Naphtalinrot, Naphtolgrün, Rhodulin-gelb T, Neugrau, Isaminblau.

Einige solcher fraglicher Farbstoffe und auch andere, die bei der Hemmung doch recht starke Wirkungen gezeigt hatten, wurden nochmals in gleicher Weise mit 0,5proz. Farbstofflösungen angesetzt. Auch dann geriet nur ein kleiner Teil mit seiner Wirksamkeit innerhalb der 24 Stundengrenze, und zwar Methylviolett B, Türkisblau, Janusgrün B, Diazinblau, Diazingrün. Andere

ließen wieder nur vermuten, daß die Abtötungsgrenze nahe lag, z. B. Echt-Baumwollblau und Dahlia. Auch hier versagten wieder stark hemmend wirkende Farbstoffe der Thiazin-Oxazin- und Azingruppe, wie z. B. Thioninblau G O, Capriblau oder Indazin P.

Liste II.

Farbstoffe, welche in 0,5proz. Lösung keine Abtötung innerhalb 24 Std. bewirken.

Einsaat: 5 Tr. dichter Coli resp. Staphylokokkenaufschwemmung in 2 cem 0,5proz. Farbstofflösung.

Magdalarot, Indazin P, Neutralblau, Tanninheliotrop, Capriblau G O, Brillantkresylblau, Nilblau-Chlorhydrat, Nilblau A, Neublau B, Echtbaumwollblau, Pyronin, Erythrosin B, Rivanol, Thionin, Neumethylenblau RRR, Methylenblau B B, Methylengrün, Thioninblau G O, Methylengelb H, Naphthalinrot.

Die innerhalb der 24 Stundengrenze bei 0,1proz. Konzentration wirksamen Farbstoffe sind auf der nächsten Liste III aufgeführt, und zwar einerseits mit größerer Einsaatmenge von 5 Tropfen pro 2 cem 0,1proz. Desinfektionslösung, andererseits mit 3 Tropfen Einsaatmenge. Die Abtötungszeiten sind durch vielfache Auswertungen gewonnen, die hier der Kürze halber nicht aufgeführt werden können. Wie zu erwarten, erwies sich bei kleinerer Einsaatmenge 1) eine größere Anzahl geprüfter Farbstoffe innerhalb der 24 Stundengrenze wirksam und 2) waren die Abtötungszeiten vielfach bedeutend verringert.

Liste III.

Farbstoffe, welche in 0,1proz. Lösung Abtötungen innerhalb 24 Std. bewirkten.

a) bei Einsaat von 3 Tropfen dichter Coli- resp. Staphylokokkenaufschwemmung.

b) bei Einsaat von 5 Tropfen dichter Coli- resp. Staphylokokkenaufschwemmung.

Farbstoff	3 Tropfen Einsaat		5 Tropfen Einsaat	
	Abtötungszeit für		Abtötungszeit für	
	Coli	Staphylokokken	Coli	Staphylokokken
28) Argochrom	25 Min.	25 Min.	5 Std.	3 Std.
1) Aethylviolett	5 Std.	5 Std.	8 „	—
2) Dahlia B	7 „	5 „	—	—
3) Kristallviolett	10 „	11 „	—	15 Std.
4) Methylviolett B	14 „	8 „	—	—
5) Gentianaviolett	13 „	5 „	—	—
9) Brillantgrün	11 „	8 „	13 Std.	8 Std.
10) Malachitgrünchlorzink	16 „	8 „	21 „	8 „
11) Malachitgrün extra	20 „	22 „	—	—
18) Viktoriablau B	10 „	5 „	21 Std.	5 Std.
6) Resorzinschwarz	10 „	9 „	—	17 „
16) Methylgrün	—	10 „	—	—
17) Pyoktanin (Merck)	—	18 „	—	—
27) Argofflavin	—	23 „	10 Std.	—
12) Anilingrün	—	5 „	23 „	—
13) Solidgrün	—	17 „	—	17 Std.
14) Chinagrün	—	19 „	22 Std.	—
15) Bindschädlersgrün	—	17 „	—	—
19) Viktoriablau 4 R	—	3 „	17 Std.	—
20) Nachtblau	—	17 „	—	—
21) Brillantblau	—	17 „	—	—
22) Amethystviolett	—	11 „	—	—
23) Safranin	—	24 „	—	—
24) Naphthylenblau	—	13 „	24 Std.	—
7) Rosanilinchlorhydrat	—	—	20 „	22 Std.
25) Nilblausulfat	—	—	22 „	22 Std.
8) Rosanilinsulfat	—	—	—	20 „
26) Akridinrot B	—	—	—	22 „

Gleich blieben bei verschiedener Einsaatmenge nur die Abtötungszeiten für die Grünmarken, Brillantgrün, Malachitgrün, Chlorzink, Solidgrün und Viktoria-blau B für Staphylokokken. Wenden wir den Blick auf die konstitutionelle Zugehörigkeit der Farbstoffe, so sehen wir, daß die Farbstoffe der Triphenylmethanreihe vorherrschen, und zwar sind sowohl Körper der Grünreihe wie der Violettreihe, daneben aber auch die Viktoriablauarken vorhanden. Die stärkere Abtötungswirkung dieser letzteren ist im Gegensatz zu der fehlenden Hemmungswirkung zum Agar besonders interessant. Hier, wo ungünstige Diffusionsverhältnisse fortfallen und nur eine Adsorption an die Bakterien stattfinden kann, kommt ihnen ihr hochkolloidaler Charakter wahrscheinlich günstig für die Wirksamkeit zustatten. Dasselbe gilt vielleicht auch zum Teil für Nilblausulfat im Gegensatz zu Nilblauchlorhydrat. Außer diesen Farbstoffen finden sich an wirksamen Einzelgängern bei größerer Keimmenge nur noch Naphtylenblau (Coli) Acridinrot B, Resorcinschwarz für Staphylokokken und für beide Keimarten das Argochrom, das aber seine außerordentlich starke Wirksamkeit nur seiner Silberkomponente verdankt. Bei kleinerer Einsaatmenge wurde außer Resorcinschwarz und Naphtylenblau auch noch Safranin, Amethystviolett und Mauvein als wirksam gefunden.

Bei den Triphenylmethanen sind einzelne Violettmarken bei kleinerem Zusatz nach unseren Befunden stärker als die Grünmarken. Bei größerer Keimmenge behält nur Aethylviolett und wahrscheinlich auch Kristallviolett seine Wirksamkeit auf Coli-Keime. Dahlia und Methylviolett werden unwirksam.

Vergleichen wir, soweit nach Liste 3 dies angängig ist, die Abtötungswerte für Staphylokokken und Coli-Bakterien, so können wir im großen und ganzen nach den Ergebnissen bei großer und bei kleiner Einsaat feststellen, daß die Staphylokokken auch eher abgetötet sind. Die Werte hierzu sind in folgender Aufstellung nochmals kurz miteinander verglichen:

Abtötungszeiten für Staphylokokken und Coli.

Bei größerer Einsaatmenge		Bei kleinerer Einsaatmenge	
	Sta. Co.		Sta. Co.
Argochrom	3:5	Aethylviolett	5:5
Brillantgrün	8:14	Dahlia	5:7
Malachitgrün		Viktoriablau B	5:10
Chlorzink	8:21	Malachitgrün	
Viktoriablau	5:21	Chlorzink	8:16
		Brillantgrün	8:11
		Resorcinschwarz	9:10
		Methylviolett	8:14
		Malachitgrün extra	22:20
		Kristallviolett	11:10
		Gentianaviolett	5:13

Also nur in 2 resp. 3 Fällen ein abweichendes Verhalten der Staphylokokken-resistenz. Wir müssen dazu aber noch bedenken, daß 5 Tropfen einer dichten Staphylokokkenabschwemmung verhältnismäßig mehr Keime enthalten als 5 Tropfen einer Coli-Abschwemmung von einer Platte. Dies wurde durch vergleichende Keimzählungen, deren große Fehlergrenzen allerdings bekannt sind, ermittelt. Dadurch würde also der Wert der obigen Differenzen verstärkt werden.

Abtötungsversuche.

b) mit Farbstoffen in Verbindung mit Metallsalzen, Säure und kolloiden Metallen.

Außer der Feststellung einer praktischen Desinfektionskraft unter den erwähnten ziemlich schweren Bedingungen lag es mir daran, im Anschluß an frühere Kombinationsversuche z. B. von Langer (9) weiteres Material über die Wirkungen von Farbstoffmetallsalzkombinationen, sowie über die Unterstützung der Farbstoffwirkung durch kolloidale Metalle und Säure zu sammeln. Langer führte über die Wirkungssteigerung bei der Kombination von Acridinfarbstoffen und Metallsalzen aus, daß das Metallsalz wahrscheinlich zu einer Dispersitätsverminderung, also zu einer Erhöhung der Speicherung des Farbstoffs führen könnte. Gleichzeitig sollte dann die im Dispersitätsgrad geänderte Farbstofflösung zum Fixationsmittel des Metalls werden.

Ich wählte meine Versuchsbedingungen folgendermaßen: Lösungen von 1/100 n. HCl, 0,1proz. Cu SO₄, 1proz. Cu SO₄, 0,1 und 1proz. Cd SO₄, die an sich, wenn zu 2 ccm 5 Tropfen Bakterienaufschwemmung zugegeben waren, auch bei wiederholter Prüfung in 24 Std. keine Abtötung bewirkten, wurden dazu gebraucht, 0,1proz. Farbstofflösungen herzustellen. Diese jedesmal frisch hergestellten Mischlösungen wurden dann in der üblichen Weise (5 Tropfen auf 2 ccm) nebst der Kontrolle der reinen Farbstofflösungen zu den Desinfektionsversuchen angesetzt. Die Waschung und Aussaat erfolgte ebenso wie bei den früheren einfachen Desinfektionsversuchen. Es zeigte sich dabei, wie aus der beigefügten Liste IV, welche die Endresultate der Auswertung wiedergibt, hervorgeht, in den meisten Fällen eine nicht unerhebliche Stärkung der Wirkung in anderen Fällen aber eine Abschwächung.

Liste IV.

Versuche über Verstärkung der Farbstoffwirkung durch Metallsalze.

1/100 n HCl 0,1 resp. 1proz. Metallsalzlösungen oder 1/100 n HCl wurden zur Herstellung 0,1proz. Farbstofflösungen benutzt.

Einsaat: 5 Tr. dichter Coli resp. Staphylokokkenaufschwemmung.

Farbstoffe 0,1 %	Wirkung (Abtötung in Stunden)											
	ohne Zusatz		Farbstoff in 1/100 u. HCl		Farbstoff in 0,1 % CuSO ₄		Farbstoff in 1 % CuSO ₄		Farbstoff in 0,1 % CdSO ₄		Farbstoff in 1 % CdSO ₄	
	Coli	Sta-phyl.	Coli	Sta-phyl.	Coli	Sta-phyl.	Coli	Sta-phyl.	Coli	Sta-phyl.	Coli	Sta-phyl.
Anilingrün	23	5	24	5	22	3	22	1	22	2	(24)	2
Chinagrün	22	19	21	13	22	14	21	11	22	16	24	(24)
Rosanilinchlorhydrat	21	22	(24)	22	19	21	20	21	(24)	21	(24)	(24)
Methylgrün	(24)	10	(24)	10	(24)	10	(24)	5	(24)	11	(24)	23
Viktoriablau 4 R	20	3	17	2	16	2	11	1	(24)	3	(24)	13
Rhodulingelb T	(24)	22	(24)	20	24	22	24	21	(24)	20	(24)	(24)
Akridinrot B	(24)	22	24	22	(24)	20	24	16	24	23	(24)	(24)
Pyronin	(24)	(24)	23	(24)	23	21	24	24	(24)	(24)	(24)	(24)
Amethystviolett	(24)	11	(24)	11	(24)	11	24	10	(24)	(24)	(24)	23
Neutralblau	(24)	(24)	(24)	(24)	23	24	23	24	(24)	(24)	(24)	(24)
Capriblau	(24)	(24)	(24)	(24)	23	24	(24)	23	(24)	(24)	(24)	(24)
Neublau B	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)	24	(24)	20	(24)	(24)	(24)	(24)
Chrysoidin	(24)	(24)	(24)	(24)	22	21	21	16	(24)	21	(24)	(24)
Janusgrün B	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)	24	21	21	(24)	(24)	(24)	(24)
Methylengrün	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)	23	11	(24)	(24)	(24)	(24)

(24) eingeklammert bedeutet, daß in 24 Std. keine Abtötung der Bakterien erfolgt war.

Solche Farbstoffe, die sonst bei 24 Std. Einwirkungszeit an sich keine Abtötung bewirken konnten, gerieten jetzt mit Hilfe der Zusätze innerhalb dieser Grenzen. Dieses zeigt Neublau B, Pyronin, Capriblau, Neutralblau, Methylengrün für Coli und Staphylokokken, Janusgrün, Amethystviolett, Methylgrün, Rhodulingelb T, Acridinrot B für Coli allein. Die übrigen schon innerhalb der 24 Stunden Grenze wirksamen Marken erfuhren eine weitere Steigerung.

Die Möglichkeiten der Verstärkung waren je nach dem zu verstärkenden Farbstoff, ferner aber auch nach der verstärkenden Beimischung und nach der Bakterienart verschieden. So wurde z. B. Chrysoidin durch die wirksamen Zusätze für Coli und Staphylokokken verhältnismäßig mehr verstärkt als Capriblau oder Neutralblau. Die Verstärkungsmöglichkeit des Anilingrüns und Chinagrüns (z. B. durch Cu SO_4 Zusätze) war für Coli geringer als bei Viktoria-blau, während sich für Staphylokokken umgekehrte Verhältnisse ergaben.

Betrachten wir die Verstärkung nach der Art der Zusätze, so ist vor allem der Gegensatz zwischen Cu SO_4 und Cd SO_4 bemerkenswert. Während Cu SO_4 ziemlich regelmäßig bei allen geprüften Farbstoffen eine beachtliche Steigerung hervorrief, die in vielen Fällen bei 1proz. Anwendung größer war als bei 0,1proz. Anwendung, verhielt sich Cd SO_4 gerade umgekehrt. Einmal brachte es an sich schon bei manchen Farbstoffen sowohl bei 0,1proz. wie 1proz. Anwendung eine Abschwächung der Wirkung hervor, (z. B. bei Amethystviolett für Staphylokokken, bei Viktoria-blau für Coli, bei Methylgrün für Staphylokokken). In anderen Fällen bewirkte die 0,1proz. Anwendung noch eine Verstärkung, während die 1proz. Anwendung dann über das Maß der Kontrollwirkung hinaus abschwächte, z. B. bei Rosanilinchlorhydrat für Staphylokokken, bei Chinagrün für Staphylokokken, bei Anilingrün für Coli, bei Viktoria-blau 4 R für Staphylokokken. Es ist wohl hier die Annahme wahrscheinlich, daß die für die Wirkung günstigen Dispersitätsverhältnisse des Farbstoffs in wechselndem Maße überschritten waren.

Bei der Kombination mit 1/100 n HCl ergaben sich wechselnde Verhältnisse, teils gleiche Wirksamkeit oder sogar Abschwächung (z. B. bei Rosanilinchlorhydrat für Coli), teils leichtere und auch mal stärkere Beförderung der Wirkung (z. B. bei Viktoria-blau 4 R für Coli und Staphylokokken, bei Chinagrün für Coli und Staphylokokken).

Bei den folgenden Versuchen mit Anwendung kolloidaler Metalle mußte die Versuchsanordnung geändert werden, da ja eine Ausflockung sonst nicht zu vermeiden war. Ich ging deshalb dazu über, die Bakterien ein bestimmtes kleines Zeitmaß zunächst in den kolloidalen Metallösungen zu halten, dann wieder auszuschleudern und nach Entfernung der überstehenden kolloiden Metalllösung wieder in 0,1proz. Farbstofflösungen aufzuschwemmen. Ich erwartete dabei, daß ein gewisser Teil der kolloiden Metallteilchen dann vielleicht in die Zelle eingedrungen war oder oberflächlich absorbiert war. In ersterem Falle wurden dann im Innern der Zellen wahrscheinlich später günstige Bedingungen für eine stärkere Niederschlagung des Farbstoffs an den schon haftenden Metallteilchen bewirkt, in letzterem Falle konnte eventuell auch eine Behinderung der Wirkung durch erschwerte Permeabilität oder äußerliche Ausflockung eintreten. Durch mehrmalige Kontrollen überzeugte ich mich davon, daß die Voreinwirkung mit der Lebensfähigkeit der Keime an sich vereinbar war. Deshalb schien es praktisch angängig, die Wirkungszeit von dem Moment an zu rechnen, wo die Bakterien nach der Entfernung der kolloidalen Metalllösung in 2 cem 0,1proz. Farbstofflösung suspendiert wurden.

An Metallen kamen zur Anwendung kolloides Gold (Heyden 819 Voreinwirkung $\frac{1}{2}$ und 1 Std.), 0,1proz. Choleval (Voreinwirkung 4 Std.), dann kolloi-

dales Silber (Voreinwirkung 3 Std. resp. 1 Std.) und kolloidales Kupfer (Voreinwirkung 3 Std.).

Versuche über Verstärkung der Farbstoffwirkungen durch Voreinwirkung kolloidaler Metalle.

Einsaat: 5 Tropfen dichter Coli resp. Staphylokokkenaufschwemmung zunächst in 1 cem kolloider Metallösung, dann nach dem Abzentrifugieren in 2 cem 0,1proz. Farbstofflösung.

Wirkung des Farbstoffes (Abtötung in Stunden)

Farbstoffe 0,1%	Ohne Voreinwirkung		Voreinwirkung 1 Std. Koll. Gold. Heyden 819		Voreinwirkung 4 Std. 0,1% Choleval		Voreinwirkung 3 Std. 0,1% Arg. colloid.		Voreinwirkung 3 Std. Coll. Cu (Heyden)	
	Coli	Staphyl.	Coli	Staphyl.	Coli	Staphyl.	Coli	Staphyl.	Coli	Staphyl.
Anilingrün	23	5	3	1	23	6	18	2	22	1
Rosanilinchlorhydr.	21	22	22	5	24	24	18	19	17	19
Viktoriablau 4 R	20	3	12	3	10	2	10	2	20	2
Akridinrot B	(24)	22	24	18	18	18	(24)	22	23	23
Chrysoidin A	(24)	(24)	18	19	24	23	20	16	(24)	(24)

(24) eingeklammert, bedeutet, daß in 24 Std. keine Abtötung erfolgt war.

Im Verhältnis zu den Verstärkungen durch Metallsalze wurden hierbei, wie die Liste V der Auswertungsergebnisse zeigt, teils etwa ähnliche Abkürzungen der Abtötungszeit erreicht wie dort, teils waren sie bedeutend weitergehend. Unter sich lassen sich die Werte nach dem Metallcharakter schlecht vergleichen, da der Metallgehalt der zum Teil fertigen kolloiden Lösungen verschieden ist. Auch hier wirken die Metalle ganz verschieden verstärkend, je nachdem welcher Farbstoff folgt. Z. B. wird durch Voreinwirkung von Gold die Anilingrünwirkung auf Coli außerordentlich gesteigert, während dies beim Rosanilinchlorhydrat nicht der Fall ist.

Jedenfalls kommt es nicht zu einer schlechteren Wirkung der Farbstoffe. Wie weit nur die oligodynamische Wirkung der Metalle oder die veränderte Dispersität und Adsorption der Farbstoffe an der Verstärkung beteiligt sind, läßt sich natürlich nicht entscheiden. Hier müßten erst quantitative Messungen angestellt werden, wieviel kolloidales Metall nach den verschiedenen Voreinwirkungszeiten auf die Bakterien übergegangen ist, resp. welche Keimverminderung eingetreten ist.

Die Kombinationsversuche sind außer ihrem theoretischen Interesse auch vielleicht für chemotherapeutische Zwecke nicht ohne Wert, und zwar für bestimmte äußerliche Anwendungsweisen (Wunddesinfektion usw.).

Zusammenfassung.

Ein Rückblick auf die Gesamtheit der in den vorliegenden 3 Mitteilungen wiedergegebenen Versuche läßt erkennen, daß hier innerhalb einer Reihe von Farbstoffklassen eine weitgehende Erfassung individueller und artlicher Eigentümlichkeiten der Bakterienresistenz gegen Farbstoffwirkungen erfolgt ist. — Die Veränderlichkeit der Wirkungen bei verschiedener p_H des Mediums fand zum ersten Male in größerem Maßstabe für ganze Farbstoffklassen und innerhalb verschiedener Gruppierungen von Bakterienarten eingehende Berücksichtigung.

— Bemerkenswerte Ergebnisse zeitigten Versuche über Gewöhnung an Farbstoffwirkungen, wobei unter anderem bei Brillantgrün und Methylengelb H die Möglichkeit spezifischer Festigung mit prinzipiell verschiedenem Charakter erwiesen werden konnte. — Versuche über die Wirkung der Farbstoffe auf die Bakterienkatalase zeigten deren weitgehende Beeinflußbarkeit. — Die besondere Aufmerksamkeit, die den Verhältnissen der Coli-Typhusgruppe und der Ruhrgruppe geschenkt wurde, erklärt sich aus teils theoretischen, teils praktischen Erwägungen. Für die Coli-Typhusgruppe ließ sich unter Vergleich der Farbstoffwirkungen mit den Wirkungen anorganischer Salze und unter Berücksichtigung biologischer Arteigentümlichkeiten die Trennung eines „physiologischen Hemmungstyps“ von elektiven Wirkungstypen rechtfertigen. Der physiologische Wirkungstyp, wobei Coli und Paratyphus B resistenter sind als Paratyphus A und Typhus fand sich sowohl in verschiedenen Farbstoffklassen, wie auch bei den einzelnen Farbstoffen in verschiedenen pH -Stufen wechselnd stark ausgeprägt. Von praktischer Bedeutung sind nur die scharfen Ausprägungen, wie sie vor allem Farbstoffe der Oxazin- und Azinreihe in größerer Anzahl bei bestimmten pH -Stufen bieten bei den Azinen (z. B. Amethystviolett pH 6,5, Methylenviolett 2 KA pH 6,5. Neutralviolett und Flavindulin pH 8,5, Indazin P pH 6,5 und 7,5, bei den Oxazinen z. B. Echtbaumwollblau B pH 6,5—8,5, Neublau B pH 6,5—8,5 und Capriblau pH 6,5). — In der Di- und Triphenylmethangruppe ergaben sich mit nur einigen Ausnahmen bemerkenswerte Uebereinstimmungen in der Schaffung elektiver Gruppenverhältnisse einmal für die Grünreihe mit der elektiven Hebung beider Paratyphusarten, in der Violettreihe der Paratyphen mitsamt Typhus gegenüber Coli. Wir kamen zu einer Kritik der bisher in der Praxis angewandten Stoffe der Grünreihe, gegenüber denen sich z. B. besonders durch Resorzinschwarz 7,5 und 8,5 pH , Türkisblau pH 7,5 und 8,5, Dahlia pH 8,0—8,5, aber auch durch Kristallviolett pH 8,0 sowie Fuchsin pH 8,5 weit bessere Verhältnisse schaffen lassen. — Wir bemerkten ferner, daß auch in anderen Farbstoffklassen das Vorhandensein elektiver, in der Coli-Typhusgruppe für die pathogenen Arten günstig wirkender Farbstoffe nicht selten ist. So fanden wir z. B. besonders Methylengelb H pH 8,0—8,5, Trypaflavin pH 7,5, aber auch Homokol pH 6,5, Phosphin pH 7,5 und Chinolinrot pH 8,5 für die Paratyphen, Pyronin, Acridinrot B, Homokol, alle drei bei 8,5 für alle pathogenen Keimarten empfehlenswert. Den besonderen diagnostischen Wert des Methylengelb H fanden wir durch Gebrauch bei gewissen Untersuchungen an infizierten Mäusen praktisch bestätigt. — Auch sonst ergaben sich in den Gruppen noch manche für experimentelle Zwecke wohl brauchbare Tatsachen z. B. die Unterdrückung der Schleierbildung des Proteus resp. seine elektive Hemmung durch manche Oxyptaleine, besonders durch Cyanosin, Rose bengale und Phloxin. Der besondere Wert dieser Tatsache liegt darin, daß die Coli-Typhusgruppe und die Ruhrgruppe ungeschädigt wachsen können. — Ferner konnte auf mancherlei Unterlagen für weitere Versuche einer Neugruppierung der Ruhrgruppe nach verschiedenen Gesichtspunkten aufmerksam gemacht werden sowie auf Verschiebungen der indivi-

duellen Artresistenz, je nach der pH-Stufe. Hier muß sowohl das Vorkommen von Ruhrstämmen, die bei pH 8,5 resistenter bleiben, wie auch die stärkere Beeinflussung der Resistenz von Coli gegenüber Paratyphus A und Typhus bei steigender Alkalinität im Auge behalten werden. — Die Mitberücksichtigung der Resistenz der Staphylokokken geschah in Hinsicht auf die Gram-Spezifität der Farbstoffwirkungen. Es zeigten sich bei manchen Farbstoffen eigenartige Abweichungen resp. Transgredienzerscheinungen, bei denen die Staphylokokken teilweise resistenter als Typhus waren. — Durch Mischung von Farbstoffen wurde im allgemeinen keine Gesamtverstärkung gegenüber der Wirkung der reinen Komponenten bewirkt. Die Mischwirkung stellt eine Additionswirkung dar. Im einzelnen ergaben sich beachtenswerte Erscheinungen über den Wert kleiner Zusatzmengen sowie über individuelle Reaktionen von Stämmen bei Mischwirkung. — In Desinfektionsversuchen, die mit 0,1proz. Farbstofflösungen und großer Keimmenge angesetzt waren, bewirkte nur ein kleiner Prozentsatz der Farbstoffe innerhalb 24 Std. eine völlige Abtötung. Die wirksamen Farbstoffe gehörten zumeist der Triphenylmethanreihe an. Im allgemeinen wurden die grampositiven Staphylokokken in teilweise bedeutend kürzeren Zeiten abgetötet als die gramnegativen Coli-Bakterien. Der Grundsatz der Gram-Spezifität der Farbstoffwirkung blieb also auch bei der Abtötung der Keimarten gewahrt. — Die Abtötungszeiten sowohl für Coli wie für Staphylokokken ließen sich durch Kombination der Farbstoffe mit an sich unwirksamen Metallsalz- resp. Säuremengen zum Teil bedeutend abkürzen. Es ergab sich ein bemerkenswerter Gegensatz in der Verbesserung der Wirkungen durch Cu SO_4 -Zusätze und der Verschlechterung der Wirkungen durch Cd SO_4 . — Auch durch Voreinwirkung an sich nicht abtötender Metallkolloide ließen sich zum Teil bedeutende Verstärkungen durch kolloides Gold, Silber und Kupfer erzielen. — Wenn auch die innerliche Anwendung der Farbstoffe durch viele Momente, die erst in den letzten Jahren bekannter wurde, Einschränkungen erleidet, so bleibt die äußerliche und auch lokale Anwendung bei Infektionen ein Gebiet der Farbstoffwirkungen, dessen Bearbeitung Erfolg verspricht.

Literatur.

- 1) Frei, Ztschr. f. Hyg. Bd. 75. S. 433. — 2) Churchman, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 76. S. 528. — 3) Römer, Gebb u. Löhlein, Arch. d. Ophtalm. Bd. 87. S. 1. — 4) Hoffmann, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 75. S. 137. 5) Wolf, Ebenda. Abt. I. Ref. Bd. 75. S. 318. — 6) Kriegler, Ebenda. Abt. I. Orig. Bd. 59. S. 481. — 7) Eisenberg, Ebenda. Abt. I. Orig. Bd. 71. S. 420. — 8) Reichenbach, Ebenda. Abt. I. Orig. Bd. 89. S. 15. — 9) Langer, Ebenda. Abt. I. Ref. Bd. 73. S. 145.
-

Nachdruck verboten.

Die Deutung der Ergebnisse von Desinfektionsversuchen.

Von Dr. K. Fischer (Amberg).

Mit 3 Abbildungen im Text.

Wenn auch die Ziele, die der Bakteriologe einerseits und der Desinfektionschemiker andererseits verfolgt, verschieden sind, so sind doch die zu den erstrebten Zielen führenden Wege in vielen Fällen die gleichen; es folgt daraus, daß insbesondere bei Desinfektionsversuchen die beiderseitigen Ergebnisse in reziproker Weise verwertbar sind.

Wenn wir kurz die gebräuchlichen Desinfektionsmethoden überblicken, bietet sich uns folgendes Bild:

Suspensionsmethode. Bei ihr überdeckt sich im allgemeinen die reine Desinfektionswirkung, d. h. die Wirkung des Desinfektionsmittels in der vorgesehenen Zeit, mit der Entwicklungshemmung. Da beide Wirkungen nur ausnahmsweise parallel gehen, sehr oft aber geringe Desinfektionswirkung mit starker Entwicklungshemmung verbunden ist, haben die mit der Suspensionsmethode erhaltenen Resultate nur dann Beweiskraft, wenn durch besondere Anordnungen und Kontrollen beide Wirkungen getrennt werden können. Die Ansicht, daß die Suspensionsmethode besonders einfach sei, kann bei der heute üblichen Ausrüstung der Laboratorien mit Schüttelmaschinen, Zentrifugen usw. nicht mehr aufrecht erhalten werden.

Endmethode. Sie ist die gegebene Methode, wenn gefragt ist: Wie lange muß eine bestimmte Konzentration des Desinfektionsmittels einwirken, oder welche Konzentration ist bei gegebener Höchstdauer der Einwirkungszeit zu verwenden, wenn absolut sicher vollständige Abtötung erreicht werden soll. Es darf dabei nicht außer acht gelassen werden, daß erst bei einer großen Zahl von Versuchen an verschiedenen Stämmen des gewählten Einheitskeimes die Resultate als genügend sicher und absolut gelten können. Die Endmethode ist mit Batist als Keimträger besonders von E. Hailer¹⁾, insbesondere für die Praxis der Kleider- und Wäschedesinfektion durchgebildet worden.

Die **Auszählmethode** ist für vergleichende Versuche am geeignetsten, besonders dann, wenn es sich um schwach desinfizierende Stoffe handelt. Bei diesen würde nämlich die vollständige Abtötung eine sehr lange Einwirkungszeit erfordern (mehrere Stunden), womit Fehler in unkontrollierbarem Maße heraufbeschworen würden. Um auch bei der Auszählmethode den Bedürfnissen der Praxis gerecht zu werden, vergleicht man daher den zu untersuchenden Stoff mit Standarddesinfektionsmitteln, deren absolute Eigenschaften durch die Endmethode festgestellt sind. Der klassische Vertreter der Keimträgerauszählmethoden ist das von Th. Paul²⁾ und B. Krönig 1896 eingeführte Verfahren, das als Granatenmethode bekannt wurde. Als Keimträger dienen hierbei die unter dem Namen „böhmische Triergranaten“ im Handel erhältlichen Granatoeder, die wegen ihrer durch gegenseitige Reibung abgeschliffenen Kanten und Ecken praktisch als Kugeln anzusehen sind. Vor Glaskugeln oder ähnlichen haben sie den Vorzug, daß sie von konzentrierten Säuren und Laugen auch beim Erhitzen nicht angegriffen werden, außerdem vertragen sie plötz-

1) Weyls Handbuch der Hygiene. Bd. 8. 1922 (Ambr. Barth).

2) Zschr. f. phys. Chem. Bd. 21. 1896. S. 3.

liches Erwärmen auf 200—300° und Abkühlen auf —180° anstandslos, sind durch Siebe in der gewünschten Größe leicht zu sortieren und werden von Flüssigkeiten gleichmäßig benetzt. An diese „Kristallkugeln“ läßt man die in der gewünschten Konzentration hergestellte Suspension antrocknen. Die fertigen Keimträger können gleich verwendet oder für Monate im Kohlensäure-Aethergemisch oder flüssiger Luft aufbewahrt werden, ohne an Resistenz einzubüßen. Die präparierten Granaten werden unmittelbar vor dem Versuch der Kältemischung entnommen, zu je 3 oder 5 auf besonderen Siebchen in die Desinfektionslösung gebracht, nach Ablauf der vorgesehenen Einwirkungszeit entgiftet (in eine Lösung getaucht, die die Einwirkung des Desinfektionsmittels momentan aufhebt, z. B. Sulfidion für Sublimat), nach dieser Entgiftung mit Wasser abgespült und einige Minuten in einer Schüttelmaschine mit wenig Wasser geschüttelt. Dadurch werden die Keime von ihrem Träger abgelöst und sind nun im Wasser verteilt, das in der bekannten Weise mit Agar vermischt und bebrütet wird. Was das Verfahren nach Th. Paul und B. Krönig besonders auszeichnet, das ist die außerordentliche Elastizität und Anpassungsfähigkeit an die verschiedensten Zwecke. Man kann z. B. durch Vermehrung der Zahl der einzelnen Keimträger die Genauigkeit erhöhen und umgekehrt; man kann auch nach einem orientierenden Vorversuch die Einwirkungszeiten so bestimmen, daß im voraus die zu erwartenden Keimzahlen festgelegt sind, man kann die schwach resistenten Keime, die in einem normalen Keimgemenge erfahrungsgemäß sehr zahlreich vertreten sind, wegnehmen, so daß nur wenige, hochresistente Keime übrig bleiben. Dadurch wird der Zählfehler sehr verringert; die Methode kommt praktisch einer Endmethode gleich und hat vor dieser sogar den Vorzug, daß der Endpunkt der Desinfektion nicht nur direkt aus den Resultaten entnommen, sondern auch vom Gebiet der Keimzahlen der Größenordnung 10 aus extrapoliert werden kann. Andererseits kann man sich auch in das Gebiet der hohen Keimzahlen begeben und gewinnt damit den Vorzug einer Empfindlichkeit, wie sie eine Endmethode auch nicht annähernd leistet. Man kann auch beide Verfahren kombinieren, indem man mit einer oder mehreren ganz kurzen und einer oder mehreren sehr langen Einwirkungszeiten arbeitet; in diesem Falle pflegt man mehrere Standarddesinfektionsmittel und außerdem den einfachsten Vertreter der jeweils untersuchten Stoffklasse hinzuzuziehen. So wählte z. B. F. Schlemmer¹⁾ — um eine neuere Arbeit anzuführen — zur Untersuchung organischer Chlorabspalter bei Einwirkungszeiten von 2 und 30 Minuten als Vergleichsdesinfektionsmittel Chlorwasser, 1proz. Phenol- und 1prom. Sublimatlösung. Die Ansicht, daß die Granatenmethode umständlich sei, kann heute wohl kaum mehr aufrecht erhalten werden. Eine Schüttelmaschine wird in jedem chemischen oder biologischen Laboratorium anzutreffen sein, und bei der heutigen, weitgehenden Durchbildung elektrischer Heizgeräte ist auch ein kleiner, elektrischer Brutschrank so betriebssicher, einfach zu bedienen und billig in der Anschaffung, daß auch kleinere Laboratorien sich eine komplette Ausrüstung zulegen können. Die laufenden Ausgaben für Agar usw. werden sehr erniedrigt, wenn man die neueren, kleinen Petri-Schalen von 30 mm Durchmesser verwendet. Ein weiterer Vorteil der Granatenmethode ist, daß sie weitgehende Vereinfachungen zuläßt, ohne an Genauigkeit zu verlieren. Als Beispiel möge eine Anordnung beschrieben sein, wie sie sich seit 2 Jahren bei praktischen Versuchen an den verschiedensten Desinfektionsmitteln bestens bewährte:

Die auf 6 Schrägagarröhrchen gezüchtete Reinkultur wird mit der Platin-

1) F. Schlemmer, Inaug.-Diss. München 1925.

öse abgenommen und mit wenig Wasser durch den Hahn mit weiter Bohrung in das Filtriergefäß¹⁾ [Fig. 1] ($\frac{2}{3}$ natürlicher Größe) gespült. Hierauf werden 80 ccm Wasser zugegossen, der obere Hahn geschlossen und etwa 1 Minute mit der Hand geschüttelt. Zum Abfüllen wird das Gefäß in eine große Laboratoriumsmuffe gespannt und mit der Flamme des Bunsen-Brenners der obere Trichter und die untere Kapillare sterilisiert, was das Jenaer Glas ohne weiteres verträgt. Ueber die Trichteröffnung wird oben ein kleiner Deckel gelegt, auch über die Ausflußöffnung kann man ein Uhrglas mit Loch so an einer zweiten Muffe befestigen, daß von oben keine Keime auf die Träger fallen können. Der obere Hahn wird geöffnet. Inzwischen ist durch die Filtrierplatte mit großer Porenweite (Nr. 1 nach der Bezeichnung von Schott und Gen.) genügend Suspension durchfiltriert, das Abfüllen kann sofort beginnen. Als Keimträger dienen Löffelchen aus Platin- oder der besseren Stabilität wegen aus Platiniridiumblech²⁾. Diese sind wegen der in den Stiel eingepreßten Rinne trotz der geringen Blechdicke (0,03 mm) sehr stabil, bequem und rasch zu sterilisieren (das dünne Blech kühlt auch sehr rasch ab) und für die in Frage kommenden Reagenzien unangreifbar. Durch mehr oder weniger weites Öffnen des oberen Hahnes kann man die Ausflußgeschwindigkeit in weiten Grenzen beliebig einstellen, meistens wählt man 5 Sekunden. Die planabgeschliffene Endfläche der Kapillare sorgt für gleiche Tropfengröße (Prinzip des Stalagmometers), und zwar mit einer Genauigkeit, welche die Genauigkeit des gesamten Desinfektionsversuches um ein Mehrfaches übertrifft. Am besten arbeitet man beim Abfüllen am „rollenden Band“, d. h. die 50 Löffelchen sind je in einer Schale fertig sterilisiert hintereinander auf einem Brett aufgestellt; dieses wird vom Gehilfen nach dem Abfüllen jeweils um eine Nummer weiter geschoben. Der Tropfen trocknet in kurzer Zeit an, und der Keimträger ist zum Versuch fertig. Die Löffelchen werden in die richtig temperierten Desinfektions-, Entgiftungslösungen usw. gebracht wie üblich, die vorgesehenen Kontrollen in der gleichen Weise mit destilliertem Wasser behandelt; ihre Konstanz untereinander gibt ein Maß für die Genauigkeit der Arbeit und ferner einen Anhaltspunkt für spätere Versuche mit anderen Stämmen. Die entgifteten und abgespülten Löffelchen werden dann mit 5 ccm Wasser in gewöhnliche Reagenzgläser gebracht, 5 Min. in der Maschine geschüttelt (Frequenz 100/min), die nach dem Schütteln trübe

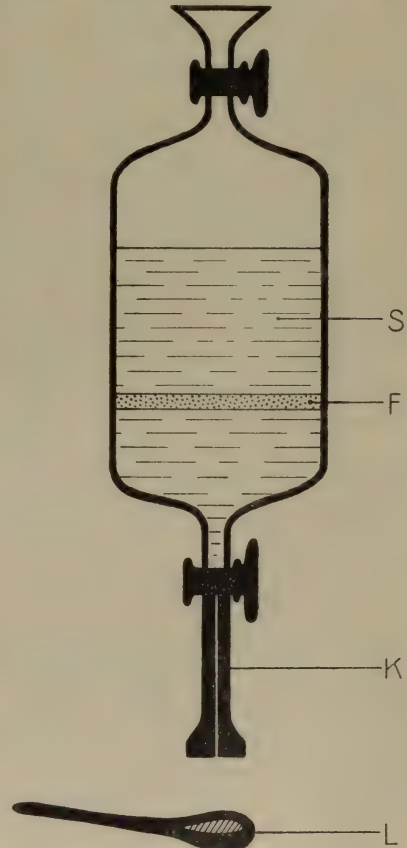


Fig. 1.

1) Bezugsquelle: Jenaer Glaswerk, Schott u. Gen. Die Figur ist $\frac{2}{3}$ der nat. Größe.

2) Bezugsquelle: Heraeus, Hanau; Platinblech mit 10proz. Iridium ist 10 Proz. teurer; der Preis eines Löffelchens stellt sich bei Selbstherstellung auf ca. 80 Pfg.

Flüssigkeit mit Agar vermischt und bebrütet. Ein Versuch, wie eben angegeben, mit 50 Löffelchen (50—17 Einzelresultaten) dauert vom Herstellen der Suspension bis einschließlich Plattengießen 30 Min. plus Zeitdauer der längsten Einwirkungszeit.

Die Art der Darstellung der Versuchsergebnisse ist von großer Wichtigkeit. Die direkte Wiedergabe der erhaltenen Werte in Form von Tabellen ist wohl einfach und für den Experimentator selbst auch übersichtlich genug, zur allgemeinen raschen Orientierung aber nicht geeignet. Die Werte müssen vielmehr umgeformt und zusammengezogen werden, so daß sie auch graphisch dargestellt werden können. Am leichtesten ist dies bei den Ergebnissen der Endmethode durchzuführen, besonders, wenn man einem Vorschlag von H. Reichel¹⁾ folgt: es wird zu jeder Konzentration des Desinfektionsmittels erstens diejenige Zeit festgestellt, die in den günstigsten Fällen vollständige Abtötung bewirkte, zweitens diejenige Zeit, die in den ungünstigsten Fällen ebenfalls zur vollständigen Abtötung führte. Die Konzentrationszeitangaben geben in der graphischen Darstellung eine Maximal- und Minimalkurve der für die vollständige Abtötung in Betracht kommenden Konzentrationen und der dazu gehörigen Einwirkungszeiten. Aus der gegenseitigen Lage der Kurven läßt sich dann nicht nur ein Maß für die Resistenzschwankungen der verwendeten Keimart, sondern auch ein Ausdruck für die relative Genauigkeit der Beobachtung ableiten. Sind die Werte erst einmal so zusammengefaßt, daß ihre graphische Darstellung möglich ist, dann macht auch die rechnerische Darstellung, die unter allen Umständen anzustreben ist, kaum Schwierigkeiten. Eine ausführliche Uebersicht über die Möglichkeiten der rechnerischen Interpretation der Desinfektionsergebnisse findet sich im Handbuch der mikrobiologischen Technik, Verlag Urban u. Schwarzenberg, Berlin 1922. Wir haben danach für Desinfektionsmittel, die, wie Phenol in geringer Konzentration auch bei noch so langer Einwirkungszeit keine Desinfektion herbeiführen, die Bezeichnung:

$$t \cdot (C-c)^A = R^2) \dots \dots \dots I$$

Hierin ist t die Einwirkungszeit, C die angewandte Konzentration, c die unwirksame Konzentration (in einem Sondersversuch zu bestimmen), A und R Konstanten, deren Größe durch die Art der Messung der Konzentration und Zeit, sowie durch den Bakterienstamm bedingt ist. Formel I stellt also den allgemeinsten Fall dar; für Desinfektionsmittel, die auch in geringen Konzentrationen meßbare Wirkung entfalten, vereinfacht sich die Bezeichnung in:

$$t \cdot C^A = 1^2) \dots \dots \dots II$$

II ergibt sich ohne weiteres aus I, wenn $c = 0$ und die Konstante A so gewählt wird, daß R der Gleichung I gleich 1 wird. Bei Einhaltung gewisser Bedingungen ergibt sich nach H. Gegenbauer⁴⁾ die Möglichkeit eines der Konzentration genau proportionalen Verlaufes der Wirkungskurve, also

$$t = C \cdot A. \dots \dots \dots III$$

Die bisherigen Betrachtungen galten in der Hauptsache für die Endmethode, sie wurden experimentell gefunden, und es soll im Nachstehenden gezeigt werden, daß sie auch theoretisch nicht unverständlich sind. Bei der

1) Handbuch der mikrobiologischen Technik. Berlin, Urban u. Schwarzenberg, 1922.

2) H. Reichel, Die Entkeimung. (Handb. d. mikrobiolog. Technik. S. 222.)

3) H. Chik u. A. Martin, An investigation of the laws of desinf. (Journ. of Hyg. Vol. 8. 1908. p. 132.)

4) H. Reichel u. H. Gegenbauer, Arch. f. Hyg. Bd. 78. 1912. S. 1.

Auszählmethode liegen die Verhältnisse aber zunächst wesentlich anders, insofern wir es hier mit einem Keimgemenge zu tun haben; in diesem Keimgemenge müssen aber zunächst, ohne zwingende experimentelle Gründe für das Gegenteil, Keime der verschiedensten Widerstandsfähigkeit angenommen werden. Entnehmen wir nämlich dem Desinfektionsmittel nach gewissen Zeitabständen die Keimträger und bestimmen die Zahl der überlebenden Keime, so ergibt sich eine Abnahme der Keimzahlen, die auf die Anwesenheit verschieden resistenter Keime hindeutet; diese zahlenmäßige Abnahme der Keimzahlen erfolgt übrigens mit einer merkwürdigen und keineswegs zu erwartenden Analogie mit einem chemischen Reaktionstyp, der „unimolekularen Reaktion“. Bei einer solchen Reaktion, etwa der Zersetzung von Jodwasserstoff im Licht, kann man das Fortschreiten der Reaktion ebenfalls dadurch beobachten, daß man auf eine bekannte Anfangsmenge (Jodwasserstoff) das Zersetzungsmedium (Licht) einwirken läßt und von Zeit zu Zeit durch Probeentnahme feststellt, wie viel noch unzersetztes Ausgangsmaterial vorhanden ist. Bei der Reaktion sowohl wie bei der Desinfektion findet der Vorgang sein natürliches Ende, wenn alle Keime abgetötet bzw. die gesamte Ausgangsmenge¹⁾ zersetzt ist. Da die widerstandsfähigsten Keime erst am Ende der „Reaktion“ dem Angriff des Desinfektionsmittels erliegen, so ist die Endmethode ein Spezialfall der Auszählmethode, wenn nämlich die Methode auf die widerstandsfähigsten Keime ausgedehnt wird. Nach dieser Formulierung müßte es aber unmöglich sein, mit der Endmethode endgültige Werte zu erhalten, da die zur vollständigen Abtötung notwendige Zeit auch von der Zahl der Ausgangskeime abhängig sein muß. Denn logischerweise muß man annehmen, daß mit der Steigerung der Primärkeimzahl auch die Wahrscheinlichkeit steigt, daß immer höher resistente Keime vorhanden sind. Da diese erst nach entsprechend längerer Einwirkungszeit verfallen, müßte auch die Endmethode je nach der Zahl der Ausgangskeime verschiedene Werte liefern. Das ist aber nicht der Fall: die Ergebnisse der Endmethode können im Gegenteil als durchaus gesichert gelten, sind unter sich, sogar bei Verwendung verschiedener Stämme gut konstant und als absolute Werte anzusehen. Wenn man nun nicht annehmen will, daß für die lebende Substanz Ausnahmegesetze gelten, insofern als etwa die Widerstandsfähigkeit von Keimen eine absolute, obere Grenze hat, dann bleibt noch der Weg, mittels der Wahrscheinlichkeitsrechnung zu bestimmen, wie groß überhaupt die Möglichkeit ist, daß Keime von höchster Resistenz in einem Gemenge anzutreffen sind. Da wir es bei einem normalen Desinfektionsversuch mit einer außerordentlich hohen Zahl von Einzelindividuen zu tun haben, so ist die Verwendung der Wahrscheinlichkeitsrechnung durchaus zu rechtfertigen. Man könnte dann an Hand von Vorversuchen mit dieser feststellen, wie hoch die Anfangskeimzahl getrieben werden muß, wenn etwa die doppelte, dreifache usw. Einwirkungszeit zur Abtötung des letzten Keimes erforderlich sein soll. Solche Untersuchungen sind, bisher wenigstens, mit dieser speziellen Absicht nicht durchgeführt worden; ihr Ergebnis ist aber durch die Praxis der Endversuche — wie bereits erwähnt — vorweg genommen worden.

Auch von einer anderen Seite können wir dem Desinfektionsvorgang näher kommen: in Wirklichkeit messen wir ja beim Desinfektionsversuch²⁾ die Sterblichkeit eines Bakterienstammes, und da liegt ein Vergleich dieser

1) Bei umkehrbarer Reaktion: der dem Gleichgewicht entsprechende Teil der Ausgangsmenge.

2) Genau genommen, wird durch den Keimversuch entschieden, ob ein Keim fortpflanzungsfähig geblieben ist. Die Frage, ob ein einzelner Keim eine Infektion hervorrufen kann oder nicht, ist trotz Mikromanipulator noch offen; für die nachstehenden Ueberlegungen ist sie übrigens belanglos.

Bakteriensterblichkeit mit der menschlichen Sterblichkeit nicht fern, zumal für letztere ein außerordentlich umfangreiches und präzises Beobachtungsmaterial vorliegt. Freilich ist dies zunächst nur ein Vergleich ohne jede Beweiskraft, stellt sich aber heraus, daß die Verhältnisse bei der menschlichen Sterblichkeit denen bei der Bakteriensterblichkeit gleich oder ähnlich sind, so läßt sich eine für weitere Versuche brauchbare, richtunggebende Arbeitshypothese finden.

Tabelle I.

Tabelle der menschlichen Sterblichkeit mit extrapolierten Werten für Jahre über 100 bis 200.

Alter in Jahren	Ueberlebende	Alter in Jahren	Ueberlebende
0	10 000	60	3 470
10	6 941	70	2 101
20	6 415	80	545
30	5 783	90	51
40	5 159	99	1
50	4 450		

von hier ab sind die Werte extrapoliert

	höchstens	vermutlich
100	0,56	0,17
102	0,18	0,005
104	0,059	$0,13 \cdot 10^{-3}$
106	0,019	$2,6 \cdot 10^{-6}$
108	$6,4 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-6}$
110	$2 \cdot 10^{-3}$	$2,6 \cdot 10^{-9}$
120	$0,69 \cdot 10^{-5}$	$0,4 \cdot 10^{-16}$
150	$0,32 \cdot 10^{-12}$	$1 \cdot 10^{-40}$
200	$0,16 \cdot 10^{-24}$	$1 \cdot 10^{-79}$

In Tabelle I ist eine der bekannten Sterblichkeitstabellen¹⁾ und in Fig. 2 ihre graphische Darstellung gegeben. Da die zugrunde liegenden statistischen Zusammenstellungen für die Zwecke der Versicherungsgesellschaften redigiert sind, schließen die Tabellen meist mit dem Lebensalter von 100 Jahren (vorliegende mit 99 Jahren), da höhere Werte für die Praxis der Versicherungsgesellschaften belanglos sind, obwohl sie erfahrungsgemäß vorkommen. Für unsere Betrachtungen sind gerade diese Werte wichtig, und deshalb sind sie für die Jahre über 100—200 extrapoliert. So unsicher Extrapolationen im allgemeinen sind, so lassen sich für den vorliegenden Fall doch Grenzwerte angeben, innerhalb deren die vermutlich richtigen Werte liegen. Die eine Reihe solcher Grenzwerte, und zwar der minimalen, ist durch die letzte tabellarisch festliegende Zahl von 99 Jahren gegeben, weil natürlich ein 99-Jähriger nicht vor Erreichung des 99. Lebensjahres sterben kann. Die andere Reihe der Grenzwerte ergibt sich, wenn man an die letzten statistischen Werte die Tangente anlegt, wie es in Fig. 2 geschehen ist. Dazwischen liegen die vermutlichen Werte, absichtlich als „vermutlich“ bezeichnet, um Verwechslungen mit dem Terminus technicus „wahrscheinlich“ zu vermeiden. Sie sind, wie ebenfalls Fig. 2 erkennen läßt, der Krümmung der Kurve entsprechend extrapoliert. Wir lesen z. B. ab: von 10 000 Geborenen erreicht einer das Alter von 99 Jahren, dagegen höchstens 0,002 das Alter von 110 Jahren. In dieser Form sind die Zahlen weniger verständlich, wir gehen dann besser von einer größeren Zahl Geborener — mit Rücksicht auf den Vergleich mit Bakterien — von 10 Milliarden aus. Von diesen erreicht also 1 Million die Altersgrenze von 99 Jahren, dagegen höchstens 2000 die von 110 Jahren. Nach einer sprachlich

1) N. Herz, Wahrscheinlichkeits- und Ausgleichungsrechnung. Leipzig 1900.

anderen Fassung können wir sagen: wenn wir nach 99 Jahren einen einzigen Ueberlebenden finden wollen, müssen wir von 10000 Geborenen ausgehen, wenn wir aber nach 110 Jahren noch einen Lebenden antreffen wollen, müssen wir mindestens von 5 Millionen, vermutlich sogar von 5 Billionen ausgehen. Oder: wenn wir die Ausgangszahl zwischen 10000 und 5 Billionen ändern, so ändert sich gleichwohl das höchste anzutreffende Lebensalter nur von 100 auf 110, also im Verhältnis 1:1,1. Gelten die gleichen Verhältnisse für Bakterien, so werden wir bei einer Ausgangskeimzahl von 10000 eine Abtötungszeit von 100 Minuten für sämtliche (oder, was dasselbe ist, für die widerstandsfähigsten) Keime benötigen; bei einer Steigerung der Anfangskeimzahl auf 5 Billionen Keime würde sich aber die maximale Einwirkungszeit nur auf 110 Minuten erhöhen. Nun können wir aus praktischen Daten errechnen,

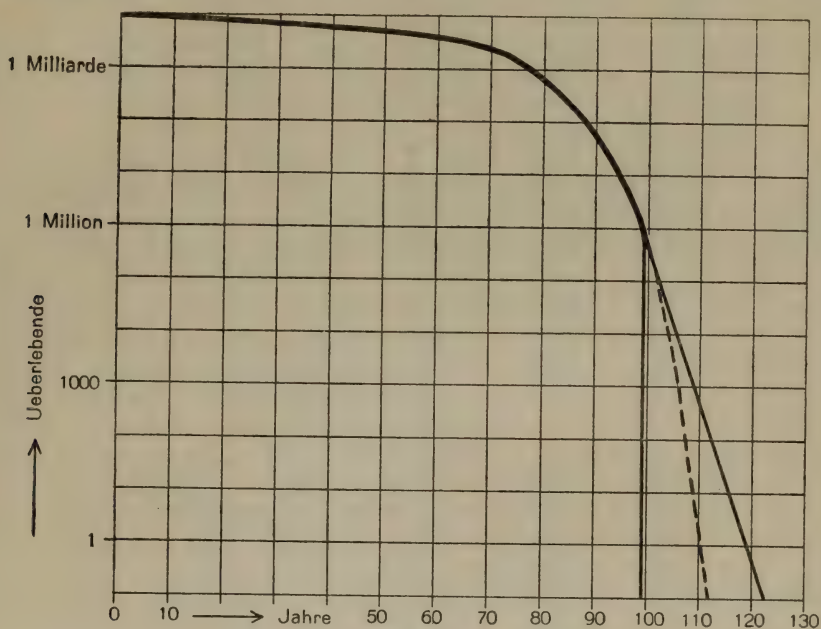


Fig. 2.

mit welchen Höchst- und Mindestmengen von Keimen wir es bei den Desinfektionsversuchen zu tun haben. Als Mindestkeimmenge wollen wir 10000 Keime annehmen, da an einer einzigen Granate, nach Th. Paul präpariert, in der Regel die 10fache Menge haftet; die Höchstkeimmenge sei 100 Billionen. Letztere Zahl wurde folgendermaßen bestimmt: ein Keim sei kugelförmig mit 0,001 mm Durchmesser angenommen, dann gehen auf einen Kubikmillimeter 10^9 Keime; wenn sie in der Form der sogenannten „dichtesten Kugelpackung“ aneinander liegen: höchstens $1,5 \cdot 10^9$ Keime, in 1 ccm konzentriertester Keimmasse sind sonach höchstens $1,5 \cdot 10^{12}$, also $1\frac{1}{2}$ Billionen Keime. Die oben erwähnten 100 Billionen Keime würden sonach 70 ccm konzentriertester Keimmasse entsprechen. Selbst wenn die Anfangskeimzahl innerhalb dieser Grenzen variieren könnte, würde man doch höchstens eine Verschiebung der maximalen Einwirkungszeit, d. h. der Endabtötungszeit von 1 auf 1,3, vermutlich sogar nur von 1 auf 1,15 beobachten. Da durch die Praxis der Enddesinfektionsversuche erwiesen ist, daß tatsächlich die Endabtötungszeiten nur wenig schwanken, kann umgekehrt gefolgert werden, daß die Bakterien-

sterblichkeit mit der menschlichen vergleichbar ist, da eben vorige Betrachtungen durch die Praxis bestätigt werden.

Sollen die bei der menschlichen Sterblichkeit obwaltenden Verhältnisse in gleicher Weise wie bisher auch auf die Ergebnisse der Desinfektionsauszählversuche angewendet werden, so sind zunächst einige Vorfragen zu klären. Wie oben schon erwähnt, wurden auf Grund der Analogie zwischen unimolekularer Reaktion und Auszählversuch die Ergebnisse letzterer durch Th. Paul und seine Mitarbeiter¹⁾ durch die „Desinfektionskonstante“ ausgedrückt (nachfolgend als D. K. bezeichnet), die in der gleichen Weise berechnet wird, wie die Reaktionsgeschwindigkeit bei einer unimolekularen Reaktion²⁾. Auf Grund dieser umfangreichen Untersuchungen kann als erwiesen gelten:

1. daß bei allen Versuchen, bei welchen die Einwirkungszeiten höchstens im Verhältnis 1:10 variierten, die D.K. innerhalb der Versuchsfehler konstant blieb,
2. daß bei allen Versuchen mit größerer Verschiedenheit der maximalen und minimalen Einwirkungszeit die D.K. einen Gang zeigte und nicht, wie zunächst anzunehmen war, um einen Mittelwert stärker schwankte.

Bei der Erklärung dieser durch die Auszählversuche aufgedeckten Verhältnisse ist es zunächst belanglos, ob die Auffassung des Desinfektionsvorganges als unimolekulare Reaktion richtig ist oder nicht; wenn nur die Ergebnisse überhaupt durch eine Konstante erfaßt werden können, ist der theoretischen Deutung der Weg gewiesen. Schon Th. Paul hat darauf hingewiesen³⁾, daß das Vorhandensein von Keimen verschiedener Resistenz in Betracht gezogen werden muß, und daß sich dies im „Gang“ der D.K. äußert. An der Tatsache, daß in einem Keimgemenge die verschiedensten Resistenzen vertreten sind, kann übrigens gar nicht gezweifelt werden, da eine andere Erklärungsweise für die im Auszählversuch beobachtete Abnahme der Keimzahlen gar nicht möglich ist. Würde nämlich ein Gemenge aus Keimen der gleichen oder annähernd gleichen Resistenz einem Desinfektionsmittel ausgesetzt, so müßte nach einer gewissen Einwirkungszeit die Keimzahl sprunghaft, rapid sinken, was noch nie beobachtet wurde. Daß also in einem Keimgemenge Keime der verschiedensten Resistenz anzunehmen sind, steht außer Zweifel; es kann sich nur darum handeln, die Frage auch quantitativ zu klären. Hierzu stehen drei Wege offen: es läßt sich auf Grund der möglichen Fälle der Resistenzverteilung, d. h. des zahlenmäßigen Verhältnisses der Keime verschiedener Resistenz zueinander, ein „künstliches“ Keimgemenge berechnen und angeben, wie es sich in einem Desinfektionsversuch verhalten, wie z. B. die Desinfektionskonstante ausfallen würde. Von allen möglichen Keimgemengen wird dann dasjenige den Verhältnissen am besten gerecht, das die beste Übereinstimmung (etwa gemessen an der D.K.) mit den experimentellen Befunden zeigt. Ferner läßt sich ein künstliches Keimgemenge auch so berechnen, daß die Desinfektionskonstante oder eine andere im praktischen Versuch als geeignet gefundene Konstante genau konstant bleibt. Endlich bleibt noch der Vergleich mit der menschlichen Sterblichkeit.

Nach der ersten Methode ist die Tabelle II, und zwar einheitlich für eine Anfangskeimzahl von 10000 berechnet. Es wurde dabei vorausgesetzt, daß Keime der Resistenz 1 in der Zeiteinheit abgetötet werden, und daß zur Ab-

1) Th. Paul, G. Birstein u. A. Reuss, Bioch. Ztschr. Bd. 29. 1910. S. 213.

2) Konstante $K = 2,303/t \cdot \log (\text{Brigg}) N/(N-n)$; t = Einwirkungszeit in Minuten, N = Anfangskeimzahl bzw. Keimzahl nach der kürzesten Einwirkungszeit, $N-n$ = die nach der jeweiligen Einwirkungszeit überlebenden Keime.

3) Th. Paul, G. Birstein u. A. Reuss, Bioch. Ztschr. Bd. 29. 1910. S. 211.

Tabelle II.

Künstliche Keimmenge unter der Annahme berechnet, daß die Grundzahlen jeweils die n -te Wurzel der vorhergehenden Grundzahl sind.

Grundzahlen

Min.	$\sqrt[2]{}$	$\sqrt[1,5]{}$	$\sqrt[1,2]{}$	$\sqrt[1,1]{}$	$\sqrt[1]{}$	$\sqrt[0,95]{}$	$\sqrt[0,9]{}$
0	9 890	9 450	7 600	5 360	1 000	23	0,004
1	99	473	1 640	2 340	1 000	37	0,01
2	10	60	408	1 065	1 000	60	0,03
4	3,2	15	155	536	1 000	102	0,12
8	1,8	5,9	65	297	1 000	183	0,47
16	1,3	3,3	30	163	1 000	327	2,3
32	1,13	2,2	16	123	1 000	608	13
64	1,06	1,6	7,4	61	1 000	1 180	93
128	1,03	1,4	4,8	40	1 000	2 420	710
256	1,01	1,2	3,4	27	1 000	5 060	9 200

Zahl der überlebenden Keime

0	10 009	10 013	10 002	10 011	10 000	10 002	10 029
1	119	563	2 402	4 651	9 000	9 979	10 029
2	20	90	762	2 311	8 000	9 942	10 029
4	10	30	282	1 246	7 000	9 882	10 029
8	6,9	15	127	710	6 000	9 777	10 028
16	5,2	9,3	62	413	5 000	9 596	10 026
32	3,9	6,0	32	251	4 000	9 269	10 013
64	2,8	3,8	16	128	3 000	8 681	9 920
128	1,7	2,2	8,6	67	2 000	7 481	9 210
256	0,7	0,8	3,8	27	1 000	5 060	10

Desinfektions-Konstante

0	—	—	—	—	—	—	—
1	6,7	2,9	1,42	0,76	0,092	0,00023	0
2	3,1	2,36	1,29	0,74	0,057	0,0023	0
4	1,73	1,45	0,90	0,52	0,033	0,0023	0
8	0,91	0,78	0,55	0,33	0,020	0,0029	0
16	0,49	0,44	0,32	0,20	0,014	0,0026	0
32	0,25	0,23	0,18	0,12	0,007	0,0024	0,000094
64	0,13	0,12	0,10	0,068	0,0043	0,0022	0,00068
128	0,08	0,07	0,06	0,040	0,0032	0,0027	0,027
256	0,04	0,04	0,03	0,017	0,0027	0,0027	0,027

tötung der Keime der doppelten, dreifachen usw. Resistenz die doppelte, dreifache usw. Einwirkungszeit erforderlich sei. Diese Annahme ist zulässig, weil sie nur den Charakter einer Definition hat, ohne über den Desinfektionsvorgang an sich etwas auszusagen. Nimmt man an, daß die Zahl der Keime der Resistenz 1:10000, die Zahl der doppelt resistenten 100, die Zahl der Keime dreifacher Resistenz 21 usw. ist, dann ergibt sich die Reihe 1 der Tabelle II, bei welcher also die „Grundzahlen“ — entsprechend den in geometrischer Progression fortschreitenden Einwirkungszeiten — jeweils die Quadratwurzeln der vorhergehenden Grundzahl sind. Für Abnahme der Keimzahlen nach anderen Potenzen ergeben sich die übrigen Tabellenwerte. Die Gesamtaddition der Grundzahlen ergibt die Zahl der überlebenden Keime für die Einwirkungszeit Null (Anfangskeimzahl), und ihre jeweilige Subtraktion die nach der betreffenden Einwirkungszeit noch vorhandenen Keime. Beispiel: es sei von jedem Resistenzgrad eine gleich große Zahl von Keimen vorhanden, also je 1000 für die angenommenen 10 Einwirkungszeiten, die Gesamtzahl der Keime beträgt

10000; die Zahl der überlebenden nach 1 Minute 10000 minus 9000, nach 2 Min. 9000 minus 8000, nach 3 Min. 8000 minus 7000 usw. Die aus den Grundzahlen sich ergebende Zahl der überlebenden Keime ergibt andererseits die Desinfektionskonstante. Da diese — wie aus der Tabelle II ersichtlich — nur bei der Reihe 7 (0,95te Wurzel der jeweils vorhergehenden Keimzahl oder Potenz: 1,05) konstant sind, läßt sich vermuten, daß bei natürlichen Keimgemengen ähnliche Verhältnisse vorliegen wie bei dem künstlichen Keimgemenge der Spalte 7. Das würde also bedeuten, daß die Zahl der Keime der verschiedensten Resistenz doch annähernd gleich ist, eher noch, daß die Zahl der höher resistenten Keime relativ größer ist als die der schwächeren. Als wesentlich ergibt sich aus dieser Betrachtung des künstlichen Keimgemenges, daß die D.K. auch konstant sein kann, wenn die Zahl der Keime verschiedener Resistenz annähernd gleich ist und daß sogar ein kontinuierliches Anwachsen der Keimzahlen (Grundzahlen) mit der Konstanz der D.K. vereinbar ist.

Ein genaueres Bild ergibt Tabelle III, welche die zu erwartenden Keimzahlen eines künstlichen Versuchs unter der Annahme einer gleichbleibenden

Tabelle III.

Künstliche Keimgemenge unter der Annahme berechnet, daß die Desinfektionskonstante konstant bleibt.

Min.	Desinfektionskonstante = 0,045		Desinfektionskonstante = 0,036		Desinfektionskonstante = 0,018	
	Grundzahlen	Ueberlebend	Grundzahlen	Ueberlebend	Grundzahlen	Ueberlebend
0	50	10 000	350	10 000	180	10 000
1	810	9 950	360	9 650	180	9 820
2	780	9 140	660	9 920	330	9 640
4	1 380	8 360	1 190	8 630	650	9 310
8	2 100	6 980	1 890	7 440	1 160	8 660
16	2 500	4 880	2 480	5 550	1 880	7 500
32	1 827	2 380	2 124	3 070	2 460	5 620
64	531	563	857	946	2 160	3 160
128	32	32	88	89	900	1 000
256		0,1		1		100

und zwar genau konstant bleibenden D.K. darstellt. Auch diese Tabelle wurde für Anfangskeimzahlen von 10000 und geometrisch fortschreitende Einwirkungszeiten berechnet, es blieb aber dabei noch ein Freiheitsgrad für die Annahme der nach der längsten Einwirkungszeit noch verbleibenden Restkeimzahl übrig. Letztere wurde für die drei berechneten Reihen zu 100 bzw. 1 bzw. 0,1 Keime angesetzt. Die Zahl 0,1 Keime besagt, daß bei 10 gedachten Parallelversuchen bei der Einwirkungszeit von 256 Min. sich mindestens 9mal die Endkeimzahl Null ergeben muß und nur 1mal die Keimzahl 1. Die drei Reihen zeigen übereinstimmend, daß die Keime einer mittleren Resistenz zahlenmäßig am stärksten vertreten sind, daß die Keimgrundzahlen nach der Seite der geringeren Resistenz nur langsam, nach der Seite der höheren Resistenz schroff abnehmen. Beispiel: für die Reihe mit der Endkeimzahl 1 beträgt für die Einwirkungszeit 32 Min. die Grundzahl 2 124, für die 4fache Einwirkungszeit nur 88, für den 4. Teil der Einwirkungszeit (8 Min.) noch 1890. Setzen wir wieder Widerstandsfähigkeit des Keimes und die zur vollständigen Abtötung erforderliche Zeit gleich, so heißt es: Keime der Resistenz 32 (also 32 Min. zur Abtötung erforderlich) sind rund 2000 vorhanden; Keime der 4fach größeren Resistenz (128 Min. Einwirkungszeit) jedoch nur 88, d. h. der 25. Teil; Keime der 4fach geringeren Resistenz sind jedoch 1900 vorhanden,

p. h. ihre Zahl ist nur um ca. 10 Proz. geringer als die der Resistenz 32. Auch wenn wir eine andere Resistenz zum Ausgangspunkte der Betrachtung wählen, z. B. 16, wo das Maximum der Grundzahlen liegt, erhalten wir das gleiche Bild: langsames Abnehmen nach der Seite der geringeren Resistenz, schroffes nach der Seite der höheren Resistenz. Die graphische Darstellung (Fig. 3) zeigt

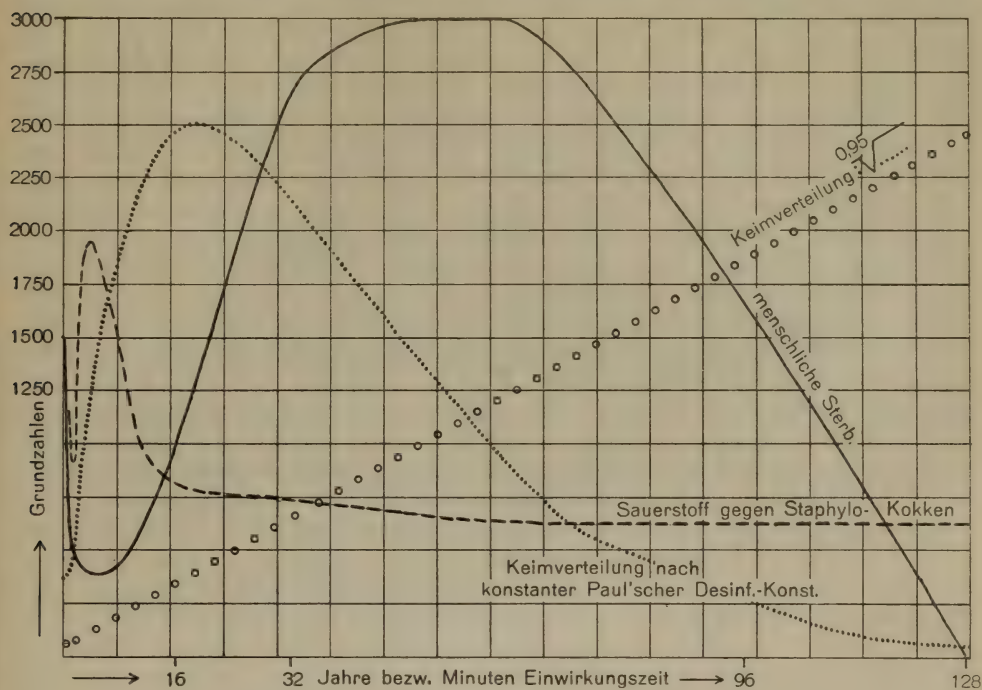


Fig. 3.

diese Verhältnisse nicht so klar, sie läßt auf den ersten Blick sogar das Gegenteil vermuten, weil die Einwirkungszahlen nach ihrem arithmetischen Wert aufgetragen sind, während für vorstehenden Vergleich die Einwirkungszeiten bzw. Resistenzen nach ihrem Verhältnisswert in Rechnung zu stellen sind.

Eine andere Seite wird aufgedeckt, wenn wir diese Ueberlegungen durch einen Vergleich mit der menschlichen Sterblichkeit ergänzen. Auch hier finden

Tabelle IV.

Menschliche Sterblichkeit und Wirkung von Sauerstoff auf Staphylokokken.

Jahre bzw. Min.	Grundzahlen		Ueberlebende	
	Menschen	Staphylokokken	Menschen	Staphylokokken
0	1 493	1 090	10 000	10 000
1	579	890	8 507	8 910
2	485	1 580	7 928	8 020
4	397	1 950	7 443	6 440
8	399	1 520	7 046	4 470
16	985	800	6 647	2 950
32	2 689	650	5 662	2 150
64	2 973	650	2 973	1 500
128	0	635	10 ⁻⁵	850

wir — Tab. IV¹⁾ — ein scharf ausgeprägtes Maximum für die den Jahren 30—60 entsprechenden Grundzahlen, daneben aber noch eine hohe Anfangsgrundzahl, die durch die Kindersterblichkeit bedingt ist. Es ist mehr als merkwürdig, daß die tatsächlichen Desinfektionsergebnisse der menschlichen Sterblichkeit so stark ähneln, daß wir sogar die der Kindersterblichkeit entsprechende Erhöhung der Anfangsgrundzahl wiederfinden. Schon Th. Paul und seine Mitarbeiter haben die große Zahl der wenig widerstandsfähigen Keime in einem Gemenge festgestellt. Sie haben, weil die Beziehung der Resultate auf diese hohe Zahl der Anfangskeime wegen deren geringer Resistenz eine erhebliche Unsicherheit in die Deutung der Versuche brachte, ihre Rechnungen immer auf die nach der ersten Einwirkungszeit erhaltenen Keimzahlen bezogen. Auszählversuche, die diese hohe Anfangskeimzahl erfassen ließen, sind sehr spärlich in der Literatur vertreten, weil sie direkt wenig praktisches Interesse beanspruchen können, sie müssen nämlich über einen möglichst großen Zeitraum ausgedehnt sein, über ein möglichst großes Verhältnis der Minimal- zur Maximaleinwirkungszeit. Einer dieser Versuche von Th. Paul, der die Wirkung von Sauerstoff auf Staphylokokken in 5—160 Min. betrifft, ist in Tabelle IV zum unmittelbaren Vergleich direkt neben die Werte der menschlichen Sterblichkeit geschrieben, wobei nur der Wert für 256 Min. und die Anfangszahl graphisch extrapoliert wurden. Wir finden die große Zahl der wenig widerstandsfähigen Anfangskeime mit einer Resistenz zwischen 0 und 1 fast ebenso groß wie die Zahl der zwischen 0 und 1 Jahren sterbenden Kinder; für die anderen Zahlen liegt nur das Maximum anders: es liegt für die Staphylokokken bei der Behandlung mit Sauerstoff etwa bei der Resistenz 4; für die menschliche Sterblichkeit fällt es in das Alter zwischen 30 und 60 Jahren, also in das Resistenzgebiet 50: wir können uns naturgemäß mindestens vorstellen, daß unter den 10000 Geborenen, von denen wir ausgehen, eine Gruppe von 2689 Menschen ist, die höchstens bis zum 32. Jahre leben werden, eine Gruppe von 2793 Menschen, deren Widerstandsfähigkeit den Stürmen des Lebens bis zum 64. Jahre trotzt. Die Tabelle zeigt weiterhin für die Staphylokokken, daß ihre Zahl nach Ueberschreitung des Maximums für die höheren Resistenzgrade nur wenig abnimmt; es kann aber daraus nicht gefolgert werden, daß dies auch für die noch höheren Resistenzwerte der Fall sein wird; dazu war eben im vorliegenden Versuch die maximale Einwirkungszeit noch zu kurz. Die Lage des Maximums sagt also noch nichts über die vermutliche Enddesinfektionszeit aus, auch wenn die für die Endmethode angestellten Ueberlegungen vollkommen zu Recht bestehen. Beispielsweise ist bei den menschlichen Sterblichkeitsverhältnissen das wahrscheinlichste Höchstalter (Enddesinfektionszeit) in der Nähe des Alters, in dem das Maximum der Widerstandsfähigkeit liegt (Maximum bei 50 Jahren, Höchstalter bei 99 Jahren); für die Staphylokokken unter der Wirkung von Sauerstoff liegt dagegen das Maximum bei der Einwirkungszeit von ca. 4 Minuten, wie lange dagegen höchstens die Staphylokokken im Sauerstoff lebensfähig bleiben, geht aus dem Versuch nicht hervor, jedenfalls ist diese Zeit erheblich größer als 128 Min. (Maximum bei 4 Min., Höchstalter größer als 128 Min.).

Einen raschen Ueberblick gestattet die Fig. 3. Hier sind die arithmetischen Werte der Grundzahlen bzw. der Jahre und Minuten Einwirkungszeit aufgetragen. Wir sehen, daß die Grundzahlen für die Keimverteilung „0,95te Wurzel“ eine Gerade bilden, die am wenigsten mit der Sterblichkeits- oder Staphylokokkenkurve harmoniert, obwohl, wie wir wissen, die Desinfektionskonstante für diese Verteilung tatsächlich konstant blieb. Der Klarheit halber

1) Die Werte der Tabelle IV sind der gleichen Tabelle aus N. Herz entnommen, sie sind für die Jahre 2, 4, 8 usw. intrapoliert.

sei nochmals erwähnt, daß Keimverteilung „0,95te Wurzel“ heißt, daß die Grundzahl für die doppelt so große Einwirkungszeit die 0,95te Wurzel der einfachen Einwirkungszeit ist, daß also bei Abstufungen der Einwirkungszeiten oder Resistenzen nach einer geometrischen Reihe mit dem Quotienten 2 die aufeinanderfolgenden Grundzahlen jeweils die 0,95te Wurzel der Grundzahl der nächstniederen Resistenz sind. Eine bessere Uebereinstimmung mit der Staphylokokkenkurve ergibt sich, wenn man die Forderung aufstellt, daß die Keimzahlen mit der D.K. verglichen, eine absolute Konstanz dieser D.K. gewährleisten sollen (Kurve ...). Die Betrachtung der Tabelle III zeigt aber, daß trotz der geringen Verschiedenheit, die die einzelnen Keimzahlen in den drei Rubriken der Tabelle III zeigen, die Desinfektionskonstanten nach ihrem absoluten Werte ganz erheblich verschieden sind, nämlich: 0,045, 0,036 und 0,018. Da also einerseits die D.K. konstant bleiben kann, wenn die Keimverteilungen außerordentlich verschieden voneinander sind, und andererseits trotz Konstanz im gleichen Versuch die Werte der D.K. stark schwanken können, auch wenn sich die Keimverteilung nicht stark verschiebt, wird sich eine ausschließliche Heranziehung der D.K. zur Charakteristik eines Keimgemenges nicht empfehlen. Dagegen kann aus der Tatsache, daß die D.K. — an ihrer Konstanz, nicht an ihrem absoluten Wert gemessen — in vielen, umfangreichen Versuchen sich bewährt hat, gefolgert werden, daß eine Verteilung nach Kurve ..., d. h. also mit einem zahlenmäßigen Maximum für eine Gruppe von Keimen besonderer Resistenz durchaus wahrscheinlich ist. Dieselbe Verteilung zeigt die Kurve der menschlichen Sterblichkeit an und die der Wirkung von Sauerstoff auf Staphylokokken entsprechende, gestrichelte Kurve der Fig. 3. Solange freilich nicht mehrere solcher Versuche, wie der in Fig. 3 zugrunde gelegte, mit sehr kurzer (5 Min.) und sehr langer Einwirkungszeit (160 Min.) vorliegen, kann nur die Vermutung gelten, daß in einem normalen Keimgemenge zwar Keime der verschiedensten Resistenz vertreten sind, daß aber die Gruppierung nach der Resistenz geordnet derart ist, daß eine sehr große Zahl wenig resistenter Keime und eine ebenfalls sehr große Zahl mittelresistenter Keime von annähernd gleicher Resistenz vorhanden ist. Die Zahl der Keime von dazwischen liegender oder darüber hinausgehender Resistenz scheint gering zu sein.

Zusammenfassung.

Die in zahlreichen Versuchen erwiesene Konstanz der Desinfektionskonstante nach Th. Paul besagt, daß in einem normalen, auf Agar gewachsenen Keimgemenge Keime der verschiedensten Resistenz vorkommen; ihre Zahl, nach Gruppen gleicher Resistenz geordnet, ist aber nicht gleich; relativ am höchsten scheint sie einerseits für die Keime ganz geringer Resistenz, die schon einem schwachen Desinfektionsmittel nach wenigen Minuten erliegen, andererseits für Keime mittlerer Resistenz zu sein. Sehr gering ist die Zahl der höchst resistenten Keime anzusetzen und noch unvergleichlich viel geringer die Wahrscheinlichkeit des Vorkommens ultrasensibler Keime selbst bei sehr hohen Anfangskeimzahlen. Letzteres dürfte wohl der Hauptgrund dafür sein, daß die Endmethode absolute Werte zu liefern vermag. Das genauest mögliche Bild von den Eigenschaften eines Keimgemenges hinsichtlich der Resistenzgruppierung kann durch einen Auszählversuch gewonnen werden, wenn er über ein möglichst großes Verhältnis der Minimal- zur Maximaleinwirkungszeit erstreckt wird.

Für die Praxis ergeben sich folgende Hinweise: Steht die Frage nach der bakteriziden Wirkung eines Stoffes im Vordergrund, so wird man für absolute Werte die Endmethode wählen, die prinzipiell am wenigsten Schwierigkeiten macht. Eine Kombination aus End- und Auszählmethode ergibt sich, wenn man eine mittlere und lange oder eine mittlere und kurze Einwirkungszeit wählt unter Heranziehung mehrerer Vergleichsdesinfektionsmittel. In diesem Falle empfiehlt es sich jedoch, nicht zwei beliebige Einwirkungszeiten zu wählen, weil man sonst Gefahr läuft, mit der einen oder anderen Einwirkungszeit gerade in das Minimumgebiet zwischen zwei zahlenmäßig überwiegenden Resistenzgruppen hineinzukommen; es empfiehlt sich vielmehr an Hand eines Vorversuches die Resistenzgliederung eines Stammes der verwendeten Keimart zu bestimmen und dann die Einwirkungszeiten so zu wählen, daß auch bei der kleinsten Konzentration noch das 2. Maximum der Resistenz erfaßt wird, was sich ja in einem rapiden Sinken der Keimzahlen nach relativ geringer Konzentrationserhöhung äußern muß. Angenommen, es sei in einem Keimgemenge diejenige Gruppe am stärksten vertreten, die bei 10 Min. Einwirkungszeit der 1proz. Konzentration des Desinfektionsmittels abgetötet wird, so wird man bei einer Einwirkungszeit von 9 Min. noch eine hohe Keimzahl feststellen können, bei 10 Min. eine wesentlich geringere, also ein rapides Sinken beobachten können. Bei 11 Min. wiederum wird nur eine gegenüber der 10 Minutenzeit geringere Abnahme feststellbar sein; die günstigste Einwirkungszeit wäre für das angegebene Desinfektionsmittel und die angegebene Konzentration somit 10 Min., besser noch 9, 10 und 11 Min. Für die doppelte Konzentration des gleichen Desinfektionsmittels wäre die günstigste Einwirkungszeit 5 Min. Entschließt man sich aber aus systematischen Gründen für 2 Desinfektionszeiten, etwa 2 und 30 Min., dann ist auf jeden Fall zur Ausschaltung zufälliger Fehler eine feinere Abstufung der gewählten Einwirkungszeit in der Nähe der gewählten anzuraten, beispielsweise $1\frac{1}{2}$, 2, $2\frac{1}{2}$ Min. einerseits und 25, 30, 35 Min. andererseits. Ausgesprochene Auszählversuche werden am besten über möglichst verschiedene, etwa geometrisch progressiv abgestufte Einwirkungszeiten ausgedehnt. Die erhaltenen Keimzahlen ergeben Grundzahlen, die ihrerseits die Eigenschaften eines Keimgemenges nach Zahl und Resistenz erschließen.

Für bakteriologische Versuche eignet sich die Desinfektionsauszählmethode besonders, weil sie empfindlich ist und die Gliederung eines Keimgemenges in einem einzigen Versuch erkennen läßt; es ist z. B. wohl denkbar, daß beim Verpflanzen eines Stammes auf einen anderen Nährboden etwa gerade die mittelresistenten Keime sich besonders stark vermehren, so daß die Resistenzgliederung des Stammes vor und nach der Ueberpflanzung geändert ist, wenn sich dies auch nur in einer Verschärfung des Maximums äußert. Die Entscheidung dieser und ähnlicher Fragen kann kaum auf andere Weise als auf dem Weg über den Desinfektionszählversuch angestrebt werden, da nur dieser die zahlenmäßige Gruppierung der Keime in einem Gemenge nach ihrer Resistenz zuläßt.

Nachdruck verboten.

Studien über die biologischen Eigenschaften der Filtrate nach Besredka¹⁾.

II. Versuche zur Analyse der immunisierenden Wirkung der Staphylokokkenfiltrate²⁾.

[Aus der Variola-Vakzineabteilung des Bakteriologischen Instituts zu Kiew (Vorstand: Privatdozent Dr. Iw. Hach).]

Von Dr. G. S. Barg.

Einführung.

Die von Besredka vorgeschlagene Immunisationsmethode gegen Staphylo- und Streptokokken (Kompressen und intrakutane Injektion der Bouillonfiltrate von Staphylo- und Streptokokkenkulturen) veranlaßte eine ziemlich große Literatur (Besredka, Urbain, Gratia, Rivalier, Gay, Mallory und Marble, Ebert und Saschina, Miller, Barg, Lange, Weichhardt u. a.), doch bleibt immer noch eine ganze Reihe von Fragen ungelöst.

In der vorliegenden Arbeit wird ein Teil der Versuche, welche ich dem Vorschlag des Herrn Privatdozenten Dr. Iw. Hach folgend, zwecks Erforschung der Filtrate angestellt habe, besprochen, nämlich Versuche über die Wirkung der Filtrate auf die Haut, welche Aufklärung geben sollen, ob sie eine streng lokale oder eine allgemeine ist, und ob sie spezifisch ist oder nicht.

Material und allgemeine Methodik.

Als Material für meine Versuche benutzte ich Bouillonkulturfiltrate von für Meerschweinchen pathogenen Stämmen von *Staph. aureus* (V₁, V₂, V₃ u. V₄). Zur Erhaltung der Filtrate wurde mit dem entsprechenden Staphylokokkenstamme gewöhnliche Martinsche Bouillon von pH 7,5—7,6 geimpft und nach 9—12tägigem Verweilen im Brutschrank bei 35—37° durch eine Chamberland-Kerze F filtriert. Die Beimpfung mit nachfolgender Filtration wurde 1—3mal wiederholt. In einzelnen Versuchen wurde das Filtrat nach einmaliger Filtration verwendet, wobei die Kultur vor der Filtration 16—24 Tage im Brutschrank gestanden hatte.

Die Filtrate wurden Meerschweinchen intrakutan à 0,15—0,2 ccm pro Injektion eingeführt, wobei jedes Mal 10—12 solcher Injektionen an verschiedenen Stellen der Haut und über den ganzen Bauch (in einigen Fällen bloß an kleinen begrenzten Hautgebieten) gemacht wurden. Nur in wenigen Fällen habe ich Kompressen angewendet, indem ich sie zuweilen mit mehreren intrakutanen Injektionen kombinierte.

In allen Versuchen mit Einführung von Filtraten oder Bouillon dienten zur Kontrolle Tiere, welche keine Injektionen erhalten haben. Bei der Ausführung der Versuche mit Filtrat resp. Bouilloninjektionen wurde das Rasieren, als einem die Haut reizenden Faktor, Beachtung geschenkt, und zwar wurden in einigen Versuchen die Schweinchen vor der Filtrat- (oder Bouillon-)Einführung rasiert, in anderen aber nur geschoren; in einigen Versuchen wurden die

1) I. Mitteilung s. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 102. 1927. S. 398.

2) Mitgeteilt dem I. Pathologenkongreß d. U. d. S. S. R. zu Kiew, 15.—20. 9. 1927.

Kontrolltiere (welche keine Injektionen erhielten) unmittelbar vor der Infizierung rasiert, in anderen aber nicht.

Die Infizierung erfolgte subkutan 1—2 Tage nach Filtrateinspritzung, stets mit einem homologen Stamm (meistens arbeitete ich mit dem *Staphyl. aureus*-Stamm V₃, in einzelnen Fällen mit den Stämmen V₁, V₂ u. V₄). In der überwiegenden Mehrzahl der Fälle wurde eine mit physiol. NaCl-Lösung abgewaschene 24stünd. Staphylokokken-Agarkultur angewendet, in anderen eine Bouillonkultur (s. u.). Die Dosis schwankte in einzelnen Versuchen von 1/12—1/80 der Agarkultur und 1 ccm bis 2,5 ccm der Bouillonkultur, entsprechend dem Virulenzgrade des Stammes. Die infizierten Versuchstiere wurden so lange beobachtet, bis alle durch die Infektion hervorgerufenen Erscheinungen zu regressieren begannen.

Alle (23) Versuche wurden ausschließlich an Meerschweinchen angestellt, und zwar die Grundversuche an ganz frischen Tieren, welche vorher keinen experimentellen Einflüssen ausgesetzt waren, ein Teil an Tieren, welche schon zu anderen Versuchen gedient hatten, 3—4 Wochen nach Temperaturabfall (nach experimentellem Fleckfieber) oder nach Diphtherieversuchen. Im ganzen wurden 171 Schweinchen gebraucht.

Ergebnisse.

I. Zunächst unternahm ich die Nachprüfung der von Besredka vorgeschlagenen Immunisationsmethode. In diesen Versuchen habe ich unabhängig davon, ob die Infektion durch Agar- oder -Bouillonkultur geschah, als Regel eine deutliche Resistenzerrhöhung der Tiere gegen die nachfolgende subkutane Infizierung (im Vergleich zu Kontrolltieren, welche mit Filtraten nicht vorbehandelt waren) erhalten. In einigen Fällen war diese Resistenzsteigerung eine sehr bedeutende: die Kontrollschweinchen gingen zugrunde oder bekamen verbreitete Hautnekrosen, die mit Filtrat vorbehandelten Meerschweinchen kamen mit kleinen Infiltraten davon, welche sich ohne Abszedierung zurückbildeten und von einer geringen Hyperplasie der regionären Lymphdrüsen begleitet waren. In anderen Fällen war der Effekt der Filtratbehandlung weniger ausgesprochen, immerhin aber ziemlich stark. In einigen Fällen aber (in der Minderzahl der Fälle) war die Resistenzerrhöhung der Meerschweinchen einer nachfolgenden Infektion gegenüber eine sehr mäßige und fand ihren Ausdruck nur darin, daß die Filtratschweinchen etwas weniger betroffen waren, als die Kontrolltiere; diese hatten z. B. große Abszesse, jene große, ohne Abszedierung sich rückbildende Infiltrate. Schließlich, und zwar in vereinzelt Versuchen, wiesen einzelne Filtratschweinchen gar keine Resistenzerrhöhung gegen Staphylokokken auf.

Wie speziell darauf gerichtete Versuche zeigten, waren diese Schwankungen nicht in merklicher Weise durch die Art der Filtratbereitung, die Dauer des Verweilens (8—16tägigen) der Bouillonkultur im Brutschrank vor der Filtration, die Anzahl der Filtrationen und Aussaaten usw. beeinflusst (vgl. die Angaben von Mallory und Marble). Vermutlich waren sie durch die individuelle Konstitution der einzelnen Meerschweinchen bedingt.

Bei diesen Versuchen habe ich bemerkt, daß eine zu starke Hautreizung durch zahlreiche Filtratinjektionen auf einem kleinen Hautbezirk die Resistenz der Meerschweinchen gegenüber Staphylokokken im negativen Sinn beeinflussen kann (s. Tab. I).

II. Des weiteren suchte ich in meiner Arbeit die Frage zu erforschen, ob dem Filtrat eine rein lokale Wirkung, nur auf die behandelten Hautbezirke, oder auf die ganze Haut im allgemeinen zukomme.

Bei diesen Versuchen erhielt eine Meerschweinchenreihe intrakutane Filtrat-injektionen, welche an einem kleinen Hautgebiete ausgeführt wurden. Nach 24—48 Std. wurden die Tiere mit Staphylokokken subkutan infiziert, und zwar die einen an der Filtratinjektionsstelle selbst, die anderen in einer bestimmten Entfernung von dem immunisierten Gebiet. Die Ergebnisse dieser Versuche ergeben sich aus Tabelle I.

Tabelle I.

versuchs- nummer	Meerschwein- chen Nr. und Infizierungs- stelle	Größe des In- jektions- bezirkes	Zahl der Injektionen und Dosis pro Injektion	Ergebnisse nach Tagen				
				1.	2.	5.	7.	8.
Versuch Nr. XVIII	130 A	3×4 cm	12×0,2 ccm	Inf. 4×6		†		
	131 A	dgl.	dgl.	Inf. 4×6		†		
	132 B	"	"	†				
	133 B	"	"	†				
	134 C	"	"	Inf. 4×2		Inf. 3×5		
	135 C	"	"	±		Inf. 1×3		
	136 K	—	0	Inf. 1/3 Abd.		Nekr. 7×7 †		
	137 K	—	0	Inf. 2/3 Abd.		Nekr. 6×8 †		
Versuch Nr. XIX	138 A	5,5×4 cm	12×0,15 ccm	Inf. 3×4	Inf. 1×3			±
	139 B	dgl.	dgl.	Inf. 2/3 Abd.	†			
	140 B	"	"	Inf. 4×5	Inf. 8×2			Nekr. 3×5
	141 C	"	"	±	Inf. 1×5			±
	142 C	"	"	±	Inf. 3×3			±
	143 K	—	0	†				
	144 K	—	0	±	Inf. 7×2			Nekr. 2×2
Versuch Nr. XXI	152 A	3×4 cm	12×0,15 ccm	Inf. 7×4	†			
	153 A	dgl.	dgl.	†				
	154 B	"	"	±	Inf. 2×4	Abs. 1×1		
	155 B	"	"	±	Inf. 2×4	Abs. 3×5		
	156 C	"	"	±	Inf. 2×4	Inf. 2×7		
	157 C	"	"	Inf. 1/3 Abd.	Inf. 1/3 Abd.	Inf. 2/3 Abd.	†	
	158 K	—	0	†				
	159 K	—	0	†				

In dieser Tabelle wie auch in den übrigen bedeutet Inf-Infiltrat, Abs-Abszeß, Nekr-Nekrosis, Er-Erosion, Abd-Abdomen. Die Zahlen geben die Dimensionen des größten Durchmessers an. Die Bezeichnung Abd 1/4 bedeutet, daß 1/4 der Haut über dem Bauch betroffen ist. ± bedeutet eine schwache Reaktion (unbedeutende Hyperplasie der regionären Lymphdrüsen oder ein ganz kleines Infiltrat), † den Tod des Tieres.

Ferner bezeichnet das bei den Nummern der Tiere gesetzte „A“, daß dem betreffenden Tier die Staphylokokkenkultur in dasselbe Gebiet, wohin vorher Filtratinjektionen erfolgt waren, eingeführt wurde, „B“ die Einführung der Staphylokokken in das dem vorbehandelten, unmittelbar anliegendes Gebiet, „C“ die Einführung in 7—8 cm Entfernung von der Filtratinjektionsstelle und „K“, daß das betreffende Tier gar kein Filtrat erhalten hat.

Wie Tab. I zeigt, wurde in meinen Versuchen mit intrakutaner Filtrat-einführung den Meerschweinchen an begrenzten Hautgebieten eine deutliche, manchmal sehr ausgesprochene Resistenzerhöhung gegenüber der nachfolgenden Staphylokokkeneinführung auch in weit von den Filtrateinführungsstellen entlegene Gebiet erzielt (s. z. B. Tiere Nr. 134, 135, 141, 142, 156, 157).

Die in dieser Tabelle zusammengestellten Versuche illustrieren zugleich die vorhin aufgestellte Behauptung, daß starke Hautreizungen die Resistenz gegenüber subkutaner Staphylokokkeneinführung herabsetzen.

Die Einführung großer Filtratmengen mit einer großen Anzahl von In-

jektionen auf begrenzten Gebieten (oder wie in anderen hier nicht angeführten Versuchen eine mehrmalige Einführung von Filtraten) verursacht anscheinlich eine starke Hautreizung und möglicherweise eine Schädigung der Haut an den Injektionsgebieten. Die an denselben oder benachbarten Gebieten infizierten Schweinchen zeigten eine schwächere Resistenz den Staphylokokken gegenüber als die nicht mit Filtraten vorbehandelten Kontrolltiere auf (Meerschweinchen Nr. 130, 131, 132, 133, 139, 140, 152, 153). Eine Resistenzerniedrigung (den Staphylokokken gegenüber) im Zusammenhang mit starker Hautreizung oder Hautschädigung habe ich auch in einigen anderen Versuchen, wo ich Filtrat-injektionen mit Kompressen anwendete, festgestellt.

III. Folgende Versuchsserien sind der Analyse der Faktoren, welche die Wirkung der Filtrate bedingen, gewidmet:

Bekanntlich erblickt Besredka das Wesen der Filtratwirkung in der Bildung eines spezifischen, thermostabilen, in das Filtrat übergehenden Faktors in den Bouillonkulturen — „Antivirus“ —, welcher das Wachstum des betreffenden Mikroorganismus *in vitro* hemmt und das Tier gegen denselben *in vivo* schützt.

In meiner früher veröffentlichten Arbeit (Barg 1) wurde festgestellt, daß die Hinzufügung eines bestimmten Kohlehydrates zum Filtrat das Filtrat in ein gutes Nährmedium für Mikroben verwandelt. Wie ich in meiner vorläufigen Mitteilung mitgeteilt habe (Barg 2), schwächt diese Umwandlung des Filtrates in ein gutes Nährmedium, deren Fähigkeit, bei intrakutaner Einführung die Resistenz gegenüber einer subkutanen Staphylokokkeninjektion zu erhöhen, nicht ab.

Zur Illustrierung der von mir bei der Immunisierung mit Kohlehydrat-filtraten erhaltenen Angaben teile ich hier die kurzen Protokolle von 2 Versuchen mit:

Versuch Nr. 4.

2 Meerschweinchen (Nr. 18 und Nr. 19) wurden auf den rasierten Bauch Kompressen aus Bouillonkulturfiltraten vom Staphylokokken V_3 appliziert und zugleich wurden den Meerschweinchen Nr. 20 und Nr. 21 Kompressen aus demselben Filtrat, welchem 1 Proz. Glukose hinzugefügt war, gemacht. Nach 24 Std. wurden die Kompressen abgenommen und den Tieren Nr. 18 und Nr. 19 intrakutan am Bauch 2 ccm eines reinen Filtrates, den Tieren Nr. 20 und 21 aber ebensoviel eines Glukosefiltrates eingeführt. 3 Tage nach der intrakutanen Injektion erhielten alle Tiere (18, 19, 20, 21) und ebenfalls das nicht vorbehandelte Kontrolltier Nr. 22 subkutan am Bauch $\frac{1}{100}$ einer 24stünd. Agarkultur V_3 . Am 7. Tage nach der Infektion war folgendes zu vermerken:

Meerschweinchen Nr. 18: Infiltrat von Erbsengröße, Hyperplasie der regionären Lymphdrüsen.

Meerschweinchen Nr. 19: Infiltrat von Haselnußgröße, das in der Folge verschwand, ohne zu abszedieren.

Meerschweinchen Nr. 20: erbsengroßes Infiltrat.

Meerschweinchen Nr. 21: erbsengroßes Infiltrat.

Kontrolltier Nr. 22: Hautnekrose über $\frac{1}{3}$ der Bauchhaut, die Nekrose verbreitete sich allmählich, und nach Abstoßen des Schorfes entstand ein Geschwür.

Versuch Nr. 5.

2 Meerschweinchen Nr. 23 und Nr. 24 war auf die rasierte Bauchhaut eine Komresse aus Bouillonfiltrat der Kultur V_3 angelegt worden. Zu gleicher Zeit wurden den Tieren Nr. 25 und 26 eine Komresse aus 1 Proz. Glukosefiltrat angelegt.

Nach 24 Std. wurden die Kompressen abgenommen. 2 Tage nach der Komresseapplikation erhielten alle Tiere (Nr. 23, 24, 25 und 26), wie auch die Kontrolltiere Nr. 27 und 28 $\frac{1}{100}$ einer 24stünd. Agarkultur von Staphylokokken V_3 .

Ergebnisse nach 10 Tagen zu vermerken: bei den Tieren Nr. 23, 24, 25, 26, ein sich lösendes Infiltrat von Stecknadelkopfgröße, beim Kontrolltier Nr. 27 Infiltrat von 5×5 cm; beim Kontrolltier Nr. 28 Infiltrat von 5×5 cm.

Auf diese Weise konnte in diesen beispielsweise angeführten, wie auch in anderen der Kürze halber nicht erwähnten Versuchen mit Glukose und

Laktosefiltraten festgestellt werden, daß die Uwandlung der Filtrate in Kohlehydratfiltrate die Fähigkeit der Filtrate, bei intrakutaner Einführung die Resistenz der Meerschweinchen gegenüber nachfolgender subkutaner Einführung von Staphylokokken zu steigern, durchaus nicht abschwächte.

Ausgehend von meinen eigenen Versuchen mit Kohlehydratfiltraten einerseits, und anderseits fußend auf den Angaben von Gratia, Rivers und Tillet, Mallory und Marble, Gay, Miller u. a. bin ich auch der Frage über die Spezifität der Filtratwirkung nachgegangen. Zu diesem Zwecke habe ich Versuche angestellt, in welchen, parallel mit der Filtratwirkung, die Haut dem Einfluß anderer Faktoren ausgesetzt wurde. Die Versuche wurden in 2 Richtungen geführt: A: die intrakutanen Filtratinjektionen wurden durch Injektionen der Ausgangsbouillon (Martinsche Bouillon von pH 7,5—7,6) ersetzt; B: anstatt der intrakutanen Injektionen wurde die Haut 1—2 Tage vor der Infizierung mechanisch gereizt.

A. Während im Gegensatz zu Besredka, Urbain, Kosmodemjanski und Panina, eine ganze Reihe von Autoren eine Resistenzerhöhung gegenüber

Zusammenfassende Tabelle II.

Tag nach der Infektion	Reines Filtrat		Reine Bouillon		Verdünntes Filtrat		Verdünnte Bouillon		Kontrolle	
	61	62	54	55	63	64	56	57	69	70
5.	±	Inf. 3×1	Inf. 1,5×5,5	±	±	±	Inf. 3×3	±	Inf. 7×2,5	Inf. 8×2,5
1.	73	74	71	72					83	84
	Inf. groß	Inf. mittel- groß	Inf. mittel- groß	Inf. groß					†	†
7.	Nekr. 2×1,5 Inf. ½ Abd.	Abs. 3×3	Nekr. 2×1,5	Nekr. 2×2,5					—	—
6.	87	88	85	86					92	
	±	±	±	±					Inf. 8×4	
1.	99	100	103		101	102	104		105	106
	Inf. 1/10 Abd.	Inf. 2×2	±		Inf. ½ Abd.	†	Inf. ¼ Abd.		±	Inf. ¼ Abd.
8.	Abs. 1×2	±	±		Abs. 6×8	—	Abs. 3×2		Nekr. 3×3	Abs. ⅓ Abd.
9.	107	108	109	111	112	110	113		114	115
	±	±	±	±	Abs. 2×1	±	Abs. 3×3		±	Nekr. 4×5 Inf. 2×3
3.	122	123		124	125	126	127		128	129
	Inf. 1,5×6,5	Inf. 3×9		Inf. 4×10	Inf. 2×2,5	†	Inf. 2×5		Inf. 4×12	Inf. 4×12
7.	Inf. 2×1	Inf. 1×4	Nekr. 4×5	Inf. 3×1	—		Inf. 3×1		Abs. 3×7	Nekr. 1×1 Abs. 3×10

Staphylo- und Streptokokken bei intrakutaner Einführung von einfacher Bouillon (Gratia, Rivers und Tillet, Mallory und Marble, Miller u. a.) festgestellt hatten, ergab sich die Notwendigkeit, bei dem Studium dieser Frage eine Methodik anzuwenden, welche erlaubte, die möglicherweise bestehende unspezifische Wirkung der Filtrate von der spezifischen oder der kombinierten spezifisch-unspezifischen zu trennen. Die diesbezüglich angewendete Methodik bestand darin, daß in den Vergleichsversuchen einer Gruppe von Meerschweinchen Filtrat, der anderen aber Bouillon eingespritzt wurde. Zur Einspritzung wurden nicht nur reine Filtrate und Bouillon, sondern auch solche mit physiol. Kochsalzlösung in verschiedener Verdünnung genommen, verwendet. Wir waren dabei der Ansicht, daß stark mit physiol. Kochsalzlösung verdünnte Bouillon möglicherweise schon keine Resistenzerhöhung mehr hervorrufen würde, während ebenso stark verdünntes Filtrat diese noch bedingen würde.

Die Ergebnisse dieser Versuche zeigt Tab. II (S. 345).

In allen diesen Versuchen wurde sowohl das Filtrat, wie auch die Bouillon (unverdünnte wie auch verdünnte) ausschließlich intrakutan (10 Injektionen à 0,2 ccm in Versuche Nr. XV à 0,15 pro Injektion) eingeführt. Diese Injektionen erfolgten an verschiedenen Stellen der Bauchhaut. (Im Versuch Nr. XII wurde die Einspritzung nach 24 Std. wiederholt). Unmittelbar vor der intrakutanen Injektion wurden die Meerschweinchen in den Versuchen X und XI rasiert, in XIV, XV aber tief geschoren, während XII im Versuch ein Teil der Tiere Nr. 86 und 88 rasiert, der andere, Nr. 85, 87, 92 geschoren wurde. Die Kontrolltiere wurden auch da, wo die Versuchstiere geschoren worden waren, ebenfalls geschoren, da aber, wo sie rasiert waren, wurden sie weder rasiert, noch geschoren. Die Verdünnung der Filtrate und der Bouillon erfolgte in den Versuchen X, XV, XVII mit physiol. Kochsalzlösung 1:3 und im Versuch XIV 1:4.

Die Infektion erfolgte in allen in T. II zusammengestellten Versuchen subkutan (in den Versuchen X, XI, XII und XIV mit einer Agarkultur; in XVII und XV mit einer Staphylokokken-Bouillonkultur), während sie in den Versuchen X, XI 48 Std. nach der intrakutanen Injektion, in XIV, XV und XVII 24 Std. danach, im Versuch XII 24 Std. nach der letzten Injektion unternommen wurde.

Wie aus Tabelle II ersichtlich ist, haben in meinen Versuchen sowohl die Bouillon, wie auch das Filtrat in der Regel die Resistenz der Meerschweinchen gegenüber der subkutanen Infizierung mit Staphylokokken erhöht. Ein merklicher Unterschied zwischen Bouillon und Filtrat (verdünnten wie unverdünnten) ist nicht zu vermerken. In verschiedenen Versuchen zeigte sich der Vorteil bald auf der Seite der Filtrate (Versuch XV, teilweise X), bald umgekehrt (Versuche XIV) und zuweilen war die Sachlage unbestimmt (Versuch XI, XVII), was wohl im Zusammenhang mit der individuellen Resistenz der Meerschweinchen den Staphylokokken und anderen nicht näher faßbaren Faktoren gegenüber stand.

B. Als mechanische Hautreizung rasierte ich die ganze untere Bauchoberfläche der Tiere 1—2 Tage vor der Infektion. Die Beobachtung der Wirkung, welche das Rasieren 1—2 Tage vor der Infektion haben kann, ist von um so größerem Interesse, wenn ein derartiges Rasieren bei der von der Mehrzahl der Autoren (Mallory und Marble und andere) verwendeten Methodik bei Versuchen mit intrakutanen Filtratinjektionen für gewöhnlich unmittelbar vor diesen, d. h. 1—2 Tage vor der Infizierung, ausgeführt wird. Das Rasieren spielt hier also die Rolle des Reizes, welchen Gröer in bezug auf Dermoreaktionen einen Applikationsreiz nennt, d. h. es handelt sich hier so zu sagen, um einen Nebenreiz, welcher nicht vom Reizagens selbst, sondern von der Art der Anwendung dieses Reizes bedingt ist.

Neben dem 1—2 Tage vor der Infektion rasierten Meerschweinchen wurden auch Versuche an solchen ausgeführt, welche unmittelbar vor der Infektion rasiert wurden. Dies ist insofern von Interesse, als in Immunisationsversuchen

mit Filtraten die Kontrolltiere (die folglich nicht mit Filtraten vorbehandelt werden) meistens unmittelbar vor der Infizierung rasiert werden.

Tabelle III.

Meerschwein- chen Nr. und Zeitpunkt des Rasierens	Ergebnisse nach Tagen								
	1	2	3	4	5	6	7	11	12
67 II					±				
68 II					Er. 0,5×0,5 Inf. 1×1				
69 K					Inf. 7×2,5				
70 K					Inf. 8×2,5				
78 I	±	Inf. ⅓ Abd.	Inf. ⅓ Abd.				Nekr. 1×1,5		
79 I	±	Inf. ⅓ Abd.	Inf. ⅓ Abd.				Abs. 3×3		
80 II	±	Inf. 3×3	Inf. 2×2				±		
81 U	Inf. ½ Abd.	Nekr. ¼ Abd.	Nekr. ½ Abd.				†		
82 U	Inf. ½ Abd.	Nekr. ⅓ Abd.	Nekr. ⅔ Abd.				†		
91 I						±			
89 II						Abs. 7×3			
90 II						Abs. 7×3			
93 U						Nekr. ¼ Abd.			
92 K						Inf. 8×4			
166 I		Inf. 2×3	Inf. 1×5	±				±	±
167 I		Inf. 4×5	Nekr. 2×2 Ränder in- filtr. 0,5 cm	Nekr. 2×2 Ränder in- filtr. 0,5 cm				Nekr. 1×2	Nekr. 1×1,5
168 U		Nekr. ⅔ Abd.	†						
169 U		Inf. ⅓ Abd.	Inf. ⅔ Abd.	Inf. ⅔ Abd.				Nekr. 2×5	Nekr. 2×5 Perf. abd. †
170 K		Inf. ½ Abd.	Inf. ⅔ Abd.	Inf. ⅔ Abd.				Nekr. ⅔ Abd.(Perf. abd.) †	
171 K		Inf. ⅔ Abd.	Inf. ⅔ Abd.	Nekr. 5×6 Ränder in- filtr. 5 cm				Nekr. 2×5 Inf. 1×4	Nekr. 2×5 Inf. 1×4

Die Ergebnisse der Versuche, in welchen die Tiere 1—2 Tage vor der Infektion und unmittelbar davor rasiert wurden, zeigt Tab. III, in welcher I bedeutet, daß die Tiere 1 Tag vor der Infizierung, II 2 Tage und „Ü“ unmittelbar davor rasiert worden sind. „K“ betrifft die Kontrolltiere, welche überhaupt nicht rasiert worden sind.

In allen obigen Versuchen, mit Ausnahme des Versuches Nr. 23, wurde das Rasieren absichtlich ohne Vorsicht (mit stumpfem Rasiermesser) ausgeführt, um die Wirkung dieser Prozedur besser feststellen zu können, während im Versuch Nr. 23 dieses mit scharfem Rasiermesser geschah, und zwar mit aller möglichen Vorsicht, damit die Haut keine sichtbaren Verletzungen erhielt. Zu bemerken ist noch, daß in allen Versuchen die ganze Bauchhaut rasiert worden ist.

Als Ergänzung zu der Sammeltabelle III möchte ich noch auf einen Versuch, welcher die Wirkung des Rasierens unmittelbar vor der Infektion (Versuch Nr. XI) aufklären sollte, zurückkommen. In diesem erhielten 2 Meerschweinchen Nr. 77 und 76 intrakutan eine gleiche Filtratmenge auf einem begrenzten Hautgebiet an der unteren Bauchfläche am linken Hinterbein. Nach 48 Std. erhielten beide Tiere subkutan je $\frac{1}{20}$ einer 24stünd. Agarkultur vom Staphylokokkenstamm V₃ in ein am Vorderbein derselben Seite gelegenes Gebiet, wobei beim Tier Nr. 77 dieses Gebiet, in das die Infizierung erfolgte, unmittelbar vor der Infektion rasiert wurde. Beim Tiere Nr. 76 wurde dagegen das entsprechende Gebiet gar nicht rasiert. Als Resultat erhielten wir beim Tier Nr. 77 am 3. Tage nach der Infektion Nekrose der Haut und am 4. Tage ging das Tier zugrunde. Tier Nr. 76 wies am 3. Tage ein Infiltrat von 6×6 cm, am 5. eine Nekrose (1×1,5) auf. In der Folge erholte sich das Tier.

Aus Tabelle III ist zu ersehen, daß im allgemeinen in meinem Material das Rasieren (speziell mit stumpfem Rasiermesser unmittelbar vor der Infizierung) die Resistenz der Meerschweinchen gegenüber Staphylokokken bei deren subkutanen Einführung in das rasierte Gebiet im allgemeinen herabsetzt und daß bei solchen Tieren oft verbreitete Nekrosen auftraten und die Tiere oft zugrunde gingen, während jene, welche nicht unmittelbar vor der Infektion rasiert waren, mit viel leichteren Beschädigungen davon kamen. Im Versuch XXIII, wo sehr vorsichtig rasiert wurde, bekam eins von den unmittelbar vor der Infizierung rasierten Meerschweinchen wiederum eine verbreitete Nekrose, und ging am 3. Tage zugrunde, wobei es eine stark herabgesetzte Resistenz im Vergleich zu den nicht rasierten Kontrolltieren aufwies. Die am ganzen Bauche 1—2 Tage vor der Infizierung rasierten Tiere zeigten, wie aus der Tab. III zu ersehen ist, in einer ganzen Reihe von Versuchen, aber nicht immer, eine deutliche Resistenzerhöhung bei subkutaner Einführung von Staphylokokken in das rasierte Gebiet. So blieben z. B. im Versuche XXIII nur solche Tiere am Leben, welche 1 Tag vor der Infektion rasiert worden waren und eins von den unrasierten Kontrolltieren, wobei das Tier Nr. 171 (ein unrasiertes Kontrolltier) größere Beschädigungen aufwies, als die 1 Tag vor der Infektion rasierten Tiere.

Die Ergebnisse der oben angeführten Versuche sprechen einerseits gegen die strenge Spezifität der Filtratwirkung, anderseits bestätigen sie die Rolle einer unspezifischen, auf verschiedene Weise bewirkten Reizung der Haut als eines Faktors, welcher die Resistenz der Meerschweinchen gegen subkutane Staphylokokkeneinführung erhöht.

V. Es war von Interesse, durch direkte Versuche mit anderer Methodik nachzuprüfen, ob ein Filtrat bei Hinzufügung und Vermischung mit einer Staphylokokkenkultur diese so beeinflussen kann (durch „Antiviruswirkung“), daß das Gemisch bei Einführung einem vorher in keiner Weise gereizten Meerschweinchen schwächere Schädigungen verursacht, als die subkutane Einführung einer eben solchen Kulturdosis, vermisch mit Bouillon oder physiol. Kochsalzlösung. Als Beispiel der von mir erhaltenen Ergebnissen kann folgender Versuch dienen:

Versuch Nr. XX.

Eine 24stünd. Bouillonkultur vom Staphylokokkenstamm V₃ wurde mit physiol. Kochsalzlösung, Bouillon und Bouillonfiltrat (desselben Stammes) 1:2 vermischt. Diese Vermischung erfolgte unmittelbar vor der Infektion der Tiere, um die Vermehrung der Mikroben zu vermeiden.

Meerschweinchen Nr. 150 und 151 erhielten subkutan 4,5 ccm des Gemisches: Kultur + Filtrat.

Meerschweinchen Nr. 148, 149 ebensoviel des Gemisches: Kultur + Bouillon.

Meerschweinchen Nr. 145, 146, 147 erhielten ebensoviel des Gemisches, Kultur + physiol. Kochsalzlösung.

Von den Tieren, welche Kultur + Filtrat bekamen, ging das Tier Nr. 150 2 Tage nach der Infektion zugrunde, Nr. 151 aber 3 Tage nach der Infektion.

Von den Tieren, welche Kultur + Bouillon erhalten hatten, ging das Tier Nr. 148 3 Tage post infektionem zugrunde, während das Tier Nr. 149 eine 4×4 cm große Nekrose am 7. Tage nach der Infektion bekam.

Von den Tieren, welche Kultur + physiol. Kochsalzlösung erhalten hatten, ging das Tier Nr. 145 am 1. Tage nach der Infektion, Nr. 146 am 7. Tage nach Infektion zugrunde. Das Tier Nr. 147 wies am 7. Tage nach der Infektion ein 3×5 cm großes Infiltrat auf.

Aehnliche unbestimmte Ergebnisse erhielt ich auch in einem anderen Versuche, wo ich die Kultur mit Filtrat und physiol. NaCl-Lösung 1:2 vermischt hatte.

Wie aus diesen Experimenten zu ersehen ist, haben in beiden von mir angestellten Versuchen, die mit dem Gemisch: Filtrat + Kultur infizierten Tiere in keiner Weise den Staphylokokken gegenüber eine höhere Resistenz aufgewiesen, als die mit dem Gemisch Bouillon + Kultur oder physiol. NaCl-Lösung infizierten.

Besprechung der Ergebnisse.

Beim Durchmustern der Kontrolltierreihen in den angeführten Tabellen bemerkt man leicht, daß auch sie, die ja keine Filtrat- oder Bouilloneinspritzungen erhalten hatten, eine ganz verschiedene individuelle Resistenz gegen subkutane Staphylokokkeninfektion besitzen (vgl. z. B. Miller).

Diese Resistenz der Meerschweinchen gegen subkutane Staphylokokkeninjektion war aber in meinen Versuchen infolge experimenteller Einwirkungen bald erhöht, bald herabgesetzt.

Eine Beschädigung durch Rasieren und starke Reizung durch zahlreiche Infektionen schwächte die Resistenz der Tiere gegen nachfolgende subkutane Staphylokokkeneinführung ab (s. Tab. III, Versuche über Rasieren unmittelbar vor der Infektion Nr. XI, XVI, XXIII, desgleichen Tab. I, Versuche mit starker Reizung beschränkter Bezirke, welche durch Ausführung zahlreicher intrakutaner Injektionen auf diesem Gebiet bedingt war (vgl. z. B. Nr. XVIII, XXI) oder durch mehrmalige Injektionen an größeren Hautgebieten). In meinen oben zitierten Versuchen mit intensiver Reizung der Haut, wobei ich Kompressen auf ein rasiertes Hautgebiet mit zahlreichen intrakutanen Filtratinjektionen kombinierte, erhielt ich ebenfalls verschiedene Grade der Resistenzerniedrigung gegen Staphylokokken; die Tiere gingen zugrunde.

Die Resistenzerrhöhung wurde in meinen Versuchen in ungefähr gleichem Grade nach intrakutanem Filtrat oder Bouilloninjektionen beobachtet, falls sie keine zu starke Reizung erzeugten (vgl. Millers Angaben), oft aber auch bei mechanischer Hautreizung durch Rasieren der ganzen Bauchhaut 1—2 Tage vor der Infektion. Dabei möchte ich bemerken, daß intrakutane Bouilloneinspritzungen einen eben solchen Erfolg im Sinne der Resistenzerrhöhung, wie Filtrateinspritzungen ergaben. Die Erfolge blieben nicht nur dann gleich, wenn ich zur Injektion unverdünnte Filtrate und Bouillon verwendete, sondern auch dann, wenn ich verschiedene Filtrat- resp. Bouillonverdünnungen brauchte.

Es gaben also auch die Versuche mit verdünnten Filtraten und Bouillon keine Hinweise auf die Spezifität der Filtrate.

Die Versuche über die Resistenzerhöhung (den Staphylokokken gegenüber) infolge mechanischer Reizungen beweisen aber die große Bedeutung verschiedener Hautreizungen für die Erhöhung der Resistenz. Eine ebensolche Resistenzerhöhung ist anscheinend auch ein wichtiger Faktor in den Versuchen, in denen als Reizagens Bouillon oder Filtrate wirkten.

Auf diese Weise bestätigen meine Versuche die Rolle der Hautreizung, die Rolle der biologischen Eigenschaften der Haut als solcher in dem von Besredka festgestellten Phänomen der Resistenzerhöhung gegen subkutane Staphylokokkeneinführung bei Meerschweinchen, welche mit intrakutanen Filtratinjektionen vorbehandelt waren.

Von den 2 Komponenten, welche diese Resistenzerhöhung bewirkten, nämlich 1. Einwirkung auf die Haut (Kompressen oder intrakutane Injektionen) und 2. Einführung von Filtraten konnte diese letztere in meinen Versuchen durch Bouilloneinführung oder durch rein mechanische Reizung ersetzt werden. Die 1. Komponente aber (diese oder jene Einwirkung auf die Haut, die Hautreizung, sei es einfach durch Rasieren 1—2 Tage vor der Infektion) war durchaus notwendig zum Zustandekommen einer Resistenzerhöhung gegen subkutane Staphylokokkeneinführung. Ich möchte noch bemerken, daß die Versuche über Resistenzerhöhung der Haut gegen nachfolgende Staphylokokkeneinführung meiner Meinung nach eine gewisse Analogie darstellen mit dem in der Literatur beschriebenen Phänomen der Erhöhung der Resistenz der Haut infolge verschiedener physikalischer und chemischer Reizungen und der durch diese bewirkten reaktiv-entzündlichen Erscheinungen gegen folgende wiederholte Reizungen sowohl derselben Art, wie auch andersartigen (s. Gröer, Török, Lehner und Urbain).

Außerdem möchte ich noch auf die aus meinen Versuchen sich ergebende Bedeutung der Haut bei Staphylokokkeninfektionen hinweisen: In meinen Versuchen hat das Rasieren, besonders ein unvorsichtiges, unmittelbar vor der subkutanen Einführung von Staphylokokken, die Resistenz der Meerschweinchen diesen gegenüber stark herabgesetzt, die Inkubationsperiode stark verkürzt und zu starken Schädigungen geführt, so zur Nekrosebildung und sogar zum Tode, während die unrasierten Meerschweinchen gewöhnlich mit viel leichteren Schädigungen davonkamen (s. Tab. III). Diese Versuche reihen sich den Angaben Besredkas und den experimentellen Angaben von Hach und seinen Mitarbeitern an, welche die Bedeutung der Haut bei den Staphylokokkeninfektionen hervorheben.

Speziell sprechen meine Versuche mit Rasieren der Meerschweinchen unmittelbar vor der Infektion dafür, daß es zur richtigen Bewertung des Erfolges der Filtrateinführung nötig ist, die Kontrolltiere, welche Filtrate nicht bekommen haben, auch vor der Infektion nicht zu rasieren, denn diese Prozedur, besonders wenn sie von mehr oder minder bedeutenden Hautschädigungen begleitet ist, kann die Resistenz der Kontrolltiere gegen Staphylokokken beträchtlich verringern. Natürlich setzt sich der allgemeine Effekt des ganzen Versuches in diesen Fällen aus 2 Komponenten zusammen, nämlich der Resistenzerhöhung bei mit Filtrat behandelten Meerschweinchen und der Resistenzherabsetzung bei Kontrolltieren, deren Haut vor der Infektion traumatisiert worden ist.

Was die Frage betrifft, ob die Filtrate bei intrakutaner Einführung rein lokal wirken, oder ob sie auch eine allgemeine Wirkung ausüben können, wie aus Tab. I hervorgeht (s. Versuche XVIII und XXI), ist folgendes zu bemerken: Die intrakutane Einführung des Filtrats auf ein begrenztes Hautgebiet erhöhte die Resistenz der Meerschweinchen gegenüber den Staphylokokken bei deren

subkutaner Einführung in ein von der Filtratinjektionsstelle ziemlich entlegenes Gebiet. Es ist von Interesse, zu vermerken, daß in einigen dieser Versuche da, wo auf einem begrenzten Hautgebiet zahlreiche Filtratinjektionen ausgeführt worden waren und wo die Haut einer großen Reizung unterlag, das „immunisierte“ Hautgebiet eine schwache Resistenz den Staphylokokken gegenüber zeigte, während ein davon entferntes Hautgebiet eine große Resistenz gegen die Staphylokokken zeigte.

Meine Angaben über die Eigenschaft der Filtrate, eine Wirkung auf die Haut im ganzen und nicht nur auf das behandelte Gebiet zu erzeugen, stehen im Einklange mit denjenigen von Besredka, Urbain, Kosmodemjanski und Panina, Ebert und Sachina (s. auch Miller) und widersprechen den Angaben von Rivalier, Mallory und Marble.

Zusammenfassung.

Meerschweinchen, welche intrakutane Injektionen von Staphylokokkenbouillonkultur-Filtraten erhalten haben, wiesen in der Regel eine zweifellose Resistenzerhöhung gegen eine nachfolgende (nach 1—2 Tagen) subkutane Einführung von Staphylokokken auf. — Meerschweinchen, welche durch eine große Anzahl von intrakutanen Filtratinjektionen auf beschränktem Gebiete eine starke Hautreizung erlitten haben, zeigten in einigen Versuchen eine Resistenzerniedrigung gegen nachfolgende (nach 24 Std.) subkutane Einführung von Staphylokokken in das gereizte Gebiet selbst oder in deren unmittelbare Nähe. — Die Resistenzerhöhung gegen subkutane Staphylokokkeneinführung wurde in den von mir angestellten Versuchen an solchen Hautgebieten beobachtet, welche 8—10 cm entfernt von den mit Filtratinjektionen vorbehandelten Gebieten liegen. In einigen Fällen konnte ich hier eine Resistenzerhöhung feststellen, während die Hautgebiete, in die die Filtratinjektionen erfolgten, eine Resistenzerniedrigung ergaben. — Die Umwandlung der Filtrate durch Kohlehydratzufügung in ein gutes Nährmedium für Staphylokokken beeinflusste in keiner Weise die Fähigkeit der Filtrate, bei intrakutaner Einführung die Resistenz der Meerschweinchen gegenüber einer nachfolgenden Staphylokokkeninfektion zu erhöhen. — Meerschweinchen, welche mit intrakutanen Bouilloninjektionen vorbehandelt waren, zeigten eine deutliche Resistenzerhöhung bei nachfolgender subkutaner Staphylokokken-Einführung, welche sich nicht in merklicher Weise von derjenigen, welche durch intrakutane Filtratinjektionen hervorgerufen war, unterschied. — Meerschweinchen, welche rasiert wurden (besonders wenn das Rasieren unvorsichtig oder mit stumpfem Rasiermesser geschah) und unmittelbar danach durch intrakutane Staphylokokkeneinführung in das rasierte Gebiet infiziert wurden, ergaben oft eine starke Resistenzherabsetzung gegenüber den eingeführten Staphylokokken. Im Vergleich zu unrasierten Kontrolltieren verursachten sie oft stärkere Schädigungen mit kürzerer Inkubationsperiode. — Meerschweinchen, welche eine mechanische Reizung 1—2 Tage vor der Infektion erlitten haben (Rasieren des ganzen Bauchgebietes), zeigten oft eine deutliche Resistenzerhöhung gegenüber der nachfolgenden subkutanen Einführung von Staphylokokken. — Meerschweinchen, welche ohne vorherige Hautreizung ein Gemisch von einer

Staphylokokkenbouillonkultur mit entsprechendem Filtrat unmittelbar unter die Haut eingeführt wurde, reagierten auf die Infektion nicht anders als Kontrolltiere, welche mit Gemischen von Bouillonkulturen und physiol. Kochsalzlösung oder Bouillon vorbehandelt waren.

Literaturverzeichnis.

Barg, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 101. 1927. S. 328. — Ders., Ibid. Bd. 102. 1927. S. 398. — Besredka, Compt. Rend. de Soc. Biol. T. 89. 1923. p. 7. — Besredka et Urbain, Ibid. T. 89. 1923. p. 506; ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 76. 1924. — Besredka, Ann. Inst. Past. T. 38. 1924. p. 565. — Ders., Die lokale Immunisierung. Paris 1925 (russisch). Leipzig 1926 (deutsch). — Ebert und Saschina, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 99. 1926. — Gay, Arch. Path. a Lab. Med. Vol. 1 p. 590 (ref. Bull. de l'Institut. Past. 1926. p. 596). — Gratia, Compt. Rend. de Biol. T. 89. 1923 (zit. nach Gay, Physiologie. Reviews. Vol. 2. 1924. p. 191). — Gröer, Klin. Wochenschr. 1927. S. 97. — Ders., Dermoreaktionen. Handb. d. biol. Arbeitsmethoden, (hrsg. v. Abderhalden). — Hach, Borodaj u. Melnyk, Ukr. Med. Nachricht. 1927. Nr. 2 (ukrainisch). Ztschr. f. Immunitätsf. Bd. 54. 1928. S. 251. — Hach u. Melnyk, Ukr. Med. Nachricht. 1927. Nr. 5 (ukrainisch). Ztschr. f. Immunitätsf. Bd. 54. 1928. S. 269. — Kosmodemjanski u. Panina, Verhandl. d. 9. Allruss. Bakteriolog. Kongreß zu Moskau. 1925. — Lange, Dtsch. med. Wochenschr. 1927. Nr. 16. — Mallory a. Marble, Journ. Exp. Med. Vol. 13. 1925. Nr. 4. — Miller, Ztschr. f. Hyg. Bd. 107. 1927. S. 253. — Rivalier, Compt. Rend. Soc. Biol. T. 89. 1923. (zit. nach Mallory u. Marble). — Rivers a. Tillett, Journ. Exp. Med. Vol. 13. 1925. Nr. 2. — Török, Lehner u. Urbain, Krankheitsforschung. Bd. 1. 1925. H. 5. — Weichardt, Dtsch. med. Wochenschr. 1927. Nr. 32.

Inhalt.

- Barg, G. S.**, Studien über die biologischen Eigenschaften der Filtrate nach Besredka. II. Versuche zur Analyse der immunisierenden Wirkung der Staphylokokkenfiltrate, S. 341.
- Bürger, M., u. Grütz, O.**, Ueber mykotischen purpurroten Zahnbelag (Streptotrichosis dentium rubra). Mit 1 Tafel, S. 258.
- Burtscher, J., u. Lauter, R.**, Zur Frage der experimentellen Kaninchengonorrhöe, S. 245.
- Diernhofer, Karl**, Untersuchungen über den Bacillus pyogenes und den Pfeilerschen „Bazillus der bösartigen Euterentzündung“. Mit 5 Abbildungen im Text, S. 280.
- Fischer, Hans v.**, Versuche zum Nachweis der Spirochaeta pallida in den Lymphdrüsen von Paralytikern, S. 247.
- Fischer, K.**, Die Deutung der Ergebnisse von Desinfektionsversuchen. Mit 3 Abbildungen im Text, S. 327.
- Gildemeister, E., u. Karmann, P.**, Bestehen zwischen Variolavakzine und Lyssa Immunitätsbeziehungen? II. Mitteilung, S. 254.
- Golikova, S.**, Bacterium coli im Wirkungsgebiet alkalibildender Mikroben, S. 213.
- Groß, Hans**, Ueber Staphylokokkenfermente, S. 241.
- Heim, Ludwig**, Die Unterscheidung der Paratyphus B-, Enteritis- und Supestiferbakterien, insbesondere mit Hilfe der Gelatineplatte. Mit 1 Tafel, S. 223.
- Klieneberger, E.**, Ueber die Anfertigung von Schimmelpilzpräparaten für Kurszwecke. Mit 4 Abbildungen im Text, S. 207.
- Lehr, E.**, Zur Brauchbarkeit des Indolnachweises nach Kovács, S. 209.
- Lichtenstein, Stefania**, Zur Frage der Reinzüchtung der Tuberkelbazillen, S. 239.
- Sanfelice, Francesco**, Paravakzination und Paravakzinothérapie bei Krebs, S. 304.
- Sartorius, Fr.**, Ueber Farbstoffwirkung auf Bakterien. III. Mitteilung. Mit 1 Abbildung im Text, S. 313.
- Schmidt, Franz**, Zur Frage der Pathogenität des Bacillus suipestif., S. 276.
- Schöffner, W.**, Malaria tertiana. Die Entwicklung der Sporulationsform, Doppelinfektionen und Bemerkungen über die sogenannte Parthenogenese der Makrogameten. Mit 7 Abbildungen im Text und 1 Tafel, S. 297.
- Schumacher, Josef**, Das Ektoplasma der Hefezelle. Untersuchungen über die chemische Zusammensetzung der Zellmembran und der Kittsubstanz der Hefezelle. Mit 1 Abbildung im Text, S. 193.
- Sprehn, C.**, Diplogaster lirata (Schneider, 1866) Oerley, 1885, ein freilebender Nematode im Urin eines Mannes. Mit 2 Abbildungen im Text, S. 310.
- Tazawa, Y.**, Eine neue Variante von Paratyphus B Schottmüller, S. 219.
- Wolters, K. L., u. Dehmel, H.**, Zur Züchtung und Differenzierung der anaeroben Sporenbildner unter besonderer Berücksichtigung der Rauschbrand- und Pararauschbrandbazillen. Mit 7 Abbildungen im Text, S. 264.

Ausgegeben am 26. September 1928.

Nachdruck verboten.

Ueber den Nachweis der Polkörnchen bei Diphtherie.

Zur mikroskopischen Diphtheriediagnose.

[Aus der Parasitologischen und Vergleichend-pathologischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin (Direktor: Geheimrat Lubarsch).]

Von Dr. med. **M. Gutstein** und Dr. med. **H. Neisser**.

In einer früheren Arbeit (1) hat einer von uns die Beobachtung beschrieben, daß die Polkörnchen der Diphtheriebazillen sich bei Färbung mit Karbolazur II und nachfolgender Differenzierung metachromatisch färbten. Dies Verhalten der Polkörnchen wurde dann dazu benutzt, um sie von dem Makrogranulum (Kern der Bakterien) zu unterscheiden. In dieser Arbeit befindet sich auch eine kurze Beschreibung zweier Färbemethoden für den Nachweis der Polkörnchen, und zwar als Karbol-Azur-Essigsäure-Tannin-Phosphin- und als Karbolazur-Phosphinmethode. Die erste lieferte die Polkörnchen in rot-violetter, das Makrogranulum in grüner, das Ektoplasma in gelber Farbe, bei der zweiten erschienen die Polkörnchen schwarz, der Zelleib gelb. Da diese Färbungen sich in der Praxis für die mikroskopische Diagnose der Diphtherie als zu umständlich erwiesen haben, so stellten wir uns die Aufgabe, die Methoden so weit zu vereinfachen, daß sie dem Bedürfnisse der Praxis vollauf genügen.

Was zunächst die Eigenschaft der Metachromasie betrifft, so haben wir sie nicht nur mit Karbolazur II, sondern auch mit polychromen Methylenblau (Unna) und nachfolgender Essigsäuredifferenzierung ziemlich gut erhalten. Zuweilen zeigten die Polkörnchen auch bei Verwendung von Löfflers Methylenblau metachromatische Färbung nach derselben Differenzierung; regelmäßig erhielten wir sie jedoch nur dann, wenn wir zu einer 1proz. wässrigen Methylenblaulösung gleiche Teile einer 10proz. wässrigen Natriumkarbonatlösung zugesetzt hatten. Diese stark alkalische Methylenblaulösung ist aber nicht wesentlich von der Unnaschen polychromen Methylenblaulösung unterschieden.

Die besten Resultate lieferte eine Färbung der Bakterienausstriche mit Azur II und nachfolgender Essigsäuredifferenzierung¹⁾.

I. Azur-Essigsäure-Methode.

Verwendete Lösungen: Azur II (Kahlbaum)	1,0
Aqu. dest.	100,0
Acid. acet. glac.	3,0
Aqu. dest. ad	100,0

Technik: Die Hitze-fixierten Ausstriche werden kurz mit Azur II gefärbt. (Färbezeit 2—5 Sek.), mit Wasser abgespült, kurz in 3 Proz. Essigsäure differenziert, bis sie hellblau erscheinen, (Differenzierungszeit je nach der Dicke des Ausstrichs 1—3 Sek.) wieder mit Wasser

1) Erwähnt sei, daß, nachdem Gutstein 1925 seine Methode zum Nachweis der Metachromasie der Polkörnchen angegeben hatte, es im Jahre 1926 zwei französischen Autoren Gaté und Billa gelang, auf andere Weise die Metachromasie der Polkörnchen färberisch nachzuweisen. Das von ihnen benutzte Verfahren ist jedoch so umständlich, daß es für die Praxis kaum verwendbar sein dürfte.

abgespült und getrocknet. Statt Essigsäure kann übrigens auch 70 Proz. Alkohol zur Differenzierung verwendet werden.

Färberesultate: Die Leiber der Diphtheriebazillen erscheinen hellblau, die Polkörnchen rot bis rötlich-violett. Sie sind also metachromatisch gefärbt. Besonders schön präsentiert sich die Färbung bei Betrachtung der Präparate durch $\frac{1}{12}$ mm Objektiv mit Okular 4.

Ebenso einfach gestaltet sich die nachstehende Methode, die statt der Differenzierung eine Nachfärbung verwendet:

II. Azur-Phosphin-Methode.

Verwendete Lösungen: Azur II (Kahlbaum)	1,0
Aqu. dest.	100,0
Phosphin (Chrysanilin extra) Kahlbaum	1,0
Aqu. dest.	100,0

Technik: Die Hitze-fixierten Ausstriche werden mit Azur II gefärbt, (Färbezeit 2—3 Min.) mit Wasser abgespült, mit Phosphin nachgefärbt, (Färbezeit 2—3 Min.), wieder mit Wasser abgespült und getrocknet.

Färberesultate: Die Leiber der Bazillen erscheinen gelb, die Polkörnchen schwarz.

Nachdem die eben beschriebenen Methoden zur Färbung von Reinkulturen von Diphtheriestämmen mit Erfolg angewandt worden waren, gingen wir dazu über, Präparate von Schmierplatten zu färben. Dank dem lebenswürdigen Entgegenkommen von Herrn Oberarzt Elkeles stand uns das Untersuchungs-material des Städt. Untersuchungsamts Charlottenburg zur Verfügung. Unsere Präparate wurden im unmittelbaren Anschluß an die Herstellung der Präparate des Untersuchungsamts von den gleichen Loeffler-Platten angefertigt. Wir stellten die Diagnosen an der Hand unserer Färbungen und verglichen sie dann mit den Diagnosen des Untersuchungsamts, die auf Grund der M. Neisser-Färbung abgegeben worden waren. Diese Untersuchungen ergaben die völlige Uebereinstimmung der Resultate, und zwar erwiesen sich von 200 untersuchten Fällen 134 als negativ, 35 als positiv. Der Rest — 31 Fälle — konnte erst bei verlängerter Bebrütung entschieden werden. Der Abschluß der Untersuchung ergab hier wiederum in Uebereinstimmung mit der M. Neisser-Färbung 20 negative und 11 positive Fälle.

Die Vorzüge der Färbemethoden.

1) Die Farblösungen sind einfach herzustellen; ihre Haltbarkeit ist gut. Sie bleiben längere Zeit hindurch verwendbar.

2) Die Färbezeit ist kurz, bei der Azuressigsäuremethode sogar sehr kurz.

3) Die Farblösungen können von den Objektträgerausstrichen durchweg mit Wasser abgespült werden; ein Abklatsch von Diphtheriebazillen in das zum Trocknen benutzte Fließpapier, der bei den unabgespülten Präparaten der M. Neisser-Färbung vorkommen kann, wird so vermieden.

4) Ueber die Zuverlässigkeit der Färbemethoden für die Diagnostik, verglichen mit der M. Neisser-Färbung informiert die obenstehende Statistik. Ergänzend sei noch darauf hingewiesen, daß die Azur-Phosphin-Methode sich besonders da bewährt, wo es gilt, bei noch jungen Kulturen, die Polkörnchen im Anfangsstadium ihrer Bildung nachzuweisen. Sie erscheinen dann als feinste schwarze Pünktchen an den Enden der gelben Stäbchen.

Die Azur-Essigsäure-Methode hat vor allen mit zwei Farben hergestellten Doppelfärbungen den Vorzug, daß sie nicht nur wie diese Polkörnchen und Bazillenleiber in gesonderter Farbe darstellt, sondern daß sie auch die Formen

der Bazillenleiber scharf und klar wiederlegt. Sie ist in dieser Beziehung der Loefflerschen Methylenblaufärbung mindestens ebenbürtig und besonders gut geeignet für Präparate von der Schmierplatte, wo die Diphtheriebazillen innerhalb einer Mischflora aufgesucht werden müssen.

Metachromasie und Supravitalfärbung.

Es dürfte von Interesse sein, daß auch bei Supravital-Färbung dies Metachromasie der Polkörnchen in Erscheinung treten kann. Wir versuchten eine Supravitalfärbung mit Azur II, pol. Methylenblau, Nilblau, Viktoriablau in der Weise, daß wir auf dem Objektträger in einem Kochsalztropfen mit der Nadel Diphtheriekultur verrieben und grade soviel von den Farblösungen zusetzten, daß der Tropfen schwach bläulich erschien. Nach Auflegen des Deckgläschens warteten wir einige Minuten und untersuchten dann unter dem Mikroskop. Pol. Methylenblau, Nilblau, Viktoriablau färbten den Bazillenleib schwach blau, die Polkörnchen blau. Azur ließ bei schwach blauen Leib die Polkörnchen metachromatisch (rötlich-violett) erscheinen.

Wir haben uns natürlich die Frage vorgelegt, worauf das metachromatische Verhalten der Polkörnchen beruhen dürfte. Es liegt nahe, die Metachromasie der besonderen chemischen Zusammensetzung dieser Gebilde zuzuschreiben, insbesondere da andere Granula der Bakterien, z. B. die Kerne, die ein gebundenes Lipoid enthalten, sich färberisch durchaus verschieden verhalten. Nur an den Mikrogranula der Hefezellen hat Gutstein Metachromasieeigenschaften gegenüber polychromen Methylenblau und einigen anderen Farbstoffen nachgewiesen (1). Nun hat Schumacher (3) vor einiger Zeit angegeben, daß die Polkörnchen der Diphtheriebazillen freie Nukleinsäure enthielten. Zu dieser Annahme gelangte Schumacher auf Grund der Tatsache, daß die Polkörnchen bei der Methylenblau-Phosphin-Methode sich grün färbten, eine Eigenschaft, die für freie Nukleinsäure spezifisch sei, während Nukleoproteide bei dieser Methode gelb erscheinen. Später konnte jedoch Gutstein nachweisen, daß die Bakterienkerne, die weder freie noch gebundene Nukleinsäure, dagegen ein gebundenes Phosphatid enthalten, sich bei der Methylenblau-Phosphin-Methode ebenfalls grün färben. Enthielten nun, wie Schumacher angibt, die Polkörnchen freie Nukleinsäure, so müßte letztere bei Färbung mit Azur II und nachfolgender Differenzierung mit Essigsäure sich metachromatisch färben. Objektträgerausstriche von freier Nukleinsäure, die wir dieser Färbemethode unterwarfen, zeigten aber keine Spur von Metachromasie und waren dagegen dunkelblau gefärbt. Auf Grund dieser Versuche müssen wir den Gehalt der Polkörnchen an freier Nukleinsäure als fraglich bezeichnen 1).

Es verdient besonders betont zu werden, daß die basophilen Granulationen der Leukozyten, der sogenannten Mastzellen, hinsichtlich der Metachromasie den Polkörnchen vollkommen gleichen. Diese Tatsache legt die Annahme nahe, daß beide Granulaarten die gleiche chemische Zusammensetzung aufweisen dürften. Nun hat Unna (4) bekanntlich festgestellt, daß die Metachromasie der Mastzellengranula schwinde bei Einwirkung oxydierender und reduzierender Substanzen. Das gleiche konnten wir auch für die Metachromasie der Polkörnchen nachweisen, und zwar verloren hitzefixierte Objektträgerausstriche von Diphtheriebazillen durch 20—60 Min. lange Behandlung mit 4proz. Formalin oder durch 5—6 Std. lange Behandlung mit 20proz. Wasserstoffsuperoxyd völlig ihre Metachromasie. Wurden die so vorbehandelten Objektträgeraus-

1) Anmerkung bei der Korrektur. Neuerdings ist es mir (G.) gelungen, die Polkörner mit Sudan III zu färben. Sie dürften meines Erachtens — ebenso wie die Mastzellengranula — ein „wasserlösliches Phosphatid“ enthalten.

striche nach Wasserspülen getrocknet und nach der Azur-Essigsäure-Methode gefärbt, so erschienen Leib und Polkörnchen gleichmäßig blau gefärbt, während unvorbehandelte die übliche Metachromasie der Polkörnchen aufwiesen. Die Zeit, die das Reduktionsmittel bzw. das Oxydationsmittel einwirken muß, erwies sich für die Polkörnchen von verschiedenen Diphtheriestämmen als verschieden. Sie schwankt innerhalb der angegebenen Grenzen. Erwähnt sei, daß eine zulange Einwirkung des Oxydations- sowie des Reduktionsmittels die Polkörnchen zur Auflösung bringt. Die Reduktionswirkung durch darauffolgende Oxydation aufzuheben und umgekehrt, wie es Unna für die Metachromasie der Mastzellengranula beschreibt, gelang nicht. Allerdings lassen auch diese Reduktions- und Oxydationsversuche keinen eindeutigen Schluß auf die chemische Natur der Polkörnchen zu.

Zusammenfassung.

1) Es werden 2 neue sehr einfache Färbemethoden für Diphtheriebazillen beschrieben, die sich besonders zum Nachweis der Polkörnchen als geeignet erwiesen haben. — 2) Die Polkörnchen zeigen gegen Azur II nicht nur im fixierten Präparat, sondern auch bei der Supravitalfärbung eine ausgesprochene Metachromasie.

Literatur.

1) Gutstein, Ueber den Kern und den allgemeinen Bau der Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 95). — 2) Gaté u. Billa, Note sur un procédé de mise en évidence des corpuscules métachromatiques du bacille de Löffler et des Bacillus diphthéroïdes. (Compt. rend. Soc. de Biol. T. 94. Nr. 8). — 3) Schumacher, Welche chemische Substanz baut die Polkörnchen d. Diphtheriebazillus auf? (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 88). — 4) Unna, Biochemie der Haut. Jena (Gustav Fischer). 1913.

Nachdruck verboten.

Ueber die Züchtung der Gonokokken.

Aus dem Veterinär-medizinischen Institute der Jagell-Universität in Krakau
(Direktor: Prof. Dr. Julian Nowak).

Von Dr. **Marian Gieszczykiewicz**, a. o. Professor für Bakteriologie.

Das Problem der Züchtung der Gonokokken ist bis heute noch nicht restlos gelöst worden, obwohl schon vor etwa 40 Jahren die Reinkulturen derselben von Bumm (1) erhalten wurden.

Zumeist wird der Wertheimsche (2) Serumagar verwendet, nur wird das ursprünglich von Wertheim gebrauchte menschliche Blutserum durch andere Körperflüssigkeiten ersetzt. Aber auch dieser Nährboden erfüllt nicht immer seine Aufgabe. Klopstock und Kowarski behaupten in ihrem bekannten Praktikum der klinischen Untersuchungsmethoden (VII. Aufl. S. 297), daß der Wertheimsche Serumagar nicht absolut zuverlässig ist, da aus unbekannten Gründen das Gonokokkenwachstum auf ihm mitunter ausbleibt. Derselben Meinung sind Josef Koch (3) und andere Autoren. Solch eine Behauptung gleicht aber der Feststellung einer Lücke in unseren diesbezüglichen Kenntnissen und fordert zur genaueren Untersuchung des Problems auf.

Es wurden noch andere Methoden der Züchtung der Gonokokken angegeben, doch haben sie keine allgemeine Anerkennung gefunden. Nicht alle Arbeiten auf diesem Gebiete bedeuten einen wirklichen Fortschritt, deshalb habe ich in meinen Studien nur denjenigen

Aufmerksamkeit geschenkt, die neue Ideen mit sich bringen. Von besonderer Wichtigkeit scheinen mir diejenigen Aufsätze zu sein, welche auf zwei für das Gonokokkenwachstum wichtige Faktoren verweisen, u. zwar auf die richtige Reaktion des Nährbodens und die Anwesenheit besonderer Hormone oder Vitamine.

Schon Ghon und Schlagenhauser (4) haben auf die Bedeutung der Reaktion hingewiesen. Thalmann (5) hat als erster versucht, das Problem quantitativ zu erfassen. Er suchte durch Titration mit Natronlauge gegen Phenolphthalein einen Nähragar mit konstanter Alkaleszenz zu gewinnen, auf welchem seiner Behauptung nach das Wachstum der Gonokokken auch ohne Serumzusatz möglich ist. Die Nachprüfungen haben nur teilweise (Strömberg (6), Brongersma u. van de Velde (7), Picker (8) die Thalmannschen Angaben bestätigt, viele Forscher (Baermann (9), Rothmann (10), Alfvén (11), Jeckstadt (12), Kutscher (13) haben mit dem Thalmannschen Nährboden unbefriedigende Resultate erzielt. Diese Divergenz der Resultate kann ihren Grund darin haben, daß Thalmann nur einen Faktor solcher Nährböden erfaßt hat. Bei der Herstellung solcher Nährböden sind auch andere Faktoren (z. B. Vitamingehalt) von Bedeutung, die von einzelnen Forschern auch unbewußt berücksichtigt worden sind. Ferner war auch die Methode der Reaktionsbestimmung nicht die richtige. Wir wissen jetzt dank den bahnbrechenden Untersuchungen von Sörensen, Michaelis, Clark u. a., daß nur die Bestimmung der Konzentration der freien Wasserstoffionen uns über die Reaktion eines Nährbodens genau belehrt.

Neuestens wurde auch das Optimum der (H^+) für Gonokokken öfters bestimmt, die Ergebnisse waren aber nicht immer konstant. So fanden Cole und Lloyd (14) das Optimum bei $pH = 7,6$, Erickson und Albert (15) bei $7,4 - 7,6$, Heden (16) bei $7,2 - 7,3$, Torrey und Buckell (17) bei $7,2$, Cole und Lloyd machen darauf aufmerksam, daß, je schlechter der Nährboden, desto mehr das Wachstum der Gonokokken auf das Optimum der Reaktion beschränkt bleibt. Huntoon (18) sieht die Bedeutung der Reaktion ein, hält aber dieselbe nicht für den wichtigsten Faktor.

Vor einigen Jahren sind noch die Arbeiten von Lorentz (19) und Torahiko Ikoma (20) erschienen, in denen ein günstiger Einfluß des Zusatzes einiger organischer Säuren zum Nähragar festgestellt wird. Die Autoren führen diesen günstigen Einfluß nicht auf Wasserstoffionen, sondern auf bestimmte Anionen zurück; da sie aber die Wasserstoffionenkonzentration ihrer Nährböden nicht bestimmt haben, entbehrt in ihren eigenen Schriften diese Annahme einer überzeugenden Begründung. Bereitet man den Nährboden genau nach der Vorschrift von Torahiko Ikoma, so beträgt sein $pH = 7,3 - 7,5$, also den für Gonokokken optimalen Wert. Der Effekt ist dabei ganz derselbe, gleichgültig ob die richtige Reaktion mit Hilfe einer organischen oder anorganischen Säure eingestellt wurde. Ohne Serumzusatz ist dieser Nährboden unbrauchbar.

Cole und Lloyd behaupten, für das Gonokokkenwachstum seien 3 Faktoren notwendig und zwar 1. eine optimale Wasserstoffionenkonzentration, 2. ein bestimmter Gehalt an Aminosäuren, 3. Anwesenheit besonderer hormon- bzw. vitaminartiger Substanzen. Die Autoren betonen auch den Vorteil einer Verwendung von Milzagar anstatt Fleischagar, was schon früher von Schäfer (21) hervorgehoben wurde.

Auch Levinthal (22) weist auf die Bedeutung vitaminartiger Substanzen hin. Gleich Cole und Lloyd schöpft er dieselben aus Blut (gleichgültig ob Menschen — oder Tierblut) welches einem 2proz. Nähragar mit $pH = 7,3 - 7,5$ zugesetzt wird. Die Mischung wird dann kurz aufgekocht und durch keimfreie Watte filtriert.

Der Nährboden Huntoons (18) wird nach demselben Grundsatz bereitet; er unterscheidet sich jedoch von den oben erwähnten dadurch, daß Huntoon die vitaminartigen Substanzen nicht dem Blut, sondern dem Fleisch entnimmt.

Die Vorschrift Huntoons lautet: Man nimmt 500 gr frisches, gehacktes Fleisch, vorzugsweise Rinderherz oder Lendenstück, versetzt es mit 1000 gr Wasser, 10 gr Pepton, womöglich Bacto, 16 gr aufgequollenes Agar-Agar, 5 gr Kochsalz, 1 ganzes Ei. Alles wird in einem Topf bei ständigem Umrühren bis auf 68° erhitzt, bei dieser Temperatur mit norm. Natronlauge gegen Lackmus neutralisiert und darnach noch mit 1 ccm derselben Lauge versetzt. Dann wird die Mischung eine Stunde lang im strömenden Dampf oder in einem Wasserbade bei 100° erhitzt, der Fleischkuchen von der Wand des Topfes gelöst und nochmals $1\frac{1}{2}$ Stunden auf 100° erwärmt. Sodann hebt man den Topf ab, läßt denselben in geneigter Lage bei Zimmertemperatur eine Zeitlang stehen, befreit den flüssigen Agar vom Bodensatz durch Abpipetieren oder Dekantation und verwahrt ihn in hohen Zylindern 15 bis 20 Min. lang. Der Nährboden wird dann von Fett, welches sich unterdessen auf der Oberfläche gesammelt hat, befreit und einer fraktionierten Sterilisation unterzogen. Das Filtrieren soll womöglich vermieden werden, da die Vitamine durch Filtrierpapier, Watte u. dergl., nach Ansicht von Huntoon, adsorbiert werden. Sollte der Nährboden zu trüb erscheinen, so darf man ihn über Glaswolle oder Asbest filtrieren, event. zentrifugieren.

Ich habe den von Huntoon empfohlenen Nährboden als Basis für meine Untersuchungen gewählt und schon bei den ersten Versuchen feststellen können,

daß die Gonokokken sowohl vom Eiter her wie in Ueberimpfungen sehr gut darauf wachsen. Die Resultate waren aber nicht konstant, schlechte Serien folgten auf gute, trotzdem die Technik dieselbe blieb. Lange Zeit konnte ich mir über die fortwährend wechselnden Resultate nicht klar werden, bis es mir schließlich gelungen ist, eine gewisse Regelmäßigkeit in dem Wechsel festzustellen. Ich bemerkte, daß die besten Resultate im Sommer und im Herbst erzielt wurden, die schlechtesten dagegen im Winter und im Frühjahr. Wahrscheinlich hängt dies von der Ernährung des Rindes ab, welches im Winter mehr trockenes Futter bekommt, im Sommer dagegen auf der Weide ist, infolgedessen der Gehalt an Vitaminen je nach der Jahreszeit schwanken kann. Ähnliche Schwankungen von Vitamingehalt in der Milch im Zusammenhang mit der Art der Ernährung haben Hart, Steenbock und Ellis (23) beobachtet. Dabei ist zu bemerken, daß auch im Sommer zuweilen ungeeignete Fleischsorten vorkommen, aber die Wahrscheinlichkeit, einen guten Nährboden herzustellen, ist bedeutend größer im Sommer als im Winter. Eine mehrmonatige Aufbewahrung des fertigen Nährbodens hebt dessen Nährwert nicht auf.

Die Zubereitung nach Huntoons Vorschrift ergibt gewöhnlich einen ziemlich trüben Nährboden und ist auch ziemlich kompliziert. Ich stellte Versuche an, ob sich dieses Verfahren nicht vereinfachen ließe. Ich verwendete also nacheinander verschiedene Faktoren, von denen nach Huntoons Ansicht die Güte des Nährbodens abhängt.

Was das Fleisch anbelangt, konnte ich feststellen, daß *caeteris paribus* der Herzmuskel bessere Nährböden ergibt als andere Fleischstücke, sogar bessere als die Milz. Von den Eingeweiden gibt Milz bessere Nährböden als die Leber, die Leber wiederum bessere als die Niere. Günstige Erfolge erzielt man auch bei der Verwendung von Hoden und Hirn, jedoch sind die Hodenextrakte trüb und gallertartig; ebenso trüb sind die Hirnnährböden, deswegen kann ich sie nicht besonders empfehlen. Es ist dabei zu bemerken, daß nach Hoagland (24) die verschiedenen Tierorgane in bezug auf den Gehalt an Vitamin B einander in folgender Reihe folgen: Herz, Niere, Leber, Milz, Lunge, Hirn, Thymus, Pankreas, Gedärme, Blutserum, Blutkörperchen.

Die Nährböden für Gonokokken werden allgemein mit Pepton versetzt, manche Autoren empfehlen sogar verschiedene Peptonarten als für das Gonokokkenwachstum besonders geeignet, ohne indessen anzugeben, ob Vergleichsversuche mit anderen Peptonarten angestellt wurden. Nur Lawrynowicz (25) behauptet, Pepton sei bedeutungslos für Gonokokkenkulturen, die sogar ohne Pepton besser gedeihen. Ich konnte feststellen, daß sowohl frisch isolierte wie auch Laboratoriumsstämme des Gonokokkus ebensogut auf einem peptonfreien wie peptonreichen Nährboden wachsen und zwar ebenso mit Serumzusatz wie auf Huntoonschem Agar, welcher aus demselben Fleisch in 2 Serien bereitet wurde, wovon die eine Pepton enthielt, die andere peptonfrei war. Ich gebrauchte sowohl eigenes Peptonfabrikat (nach Martin) 2 Proz. Zusatz wie Pepton Witte oder Chapoteaut 1 Proz. Die beiden Serien waren vollkommen gleichwertig.

Manche Autoren, wie Cole und Lloyd, schreiben Aminosäuren und Polypeptiden einen besonderen Nährwert zu. Um die Richtigkeit dieser Behauptung festzustellen, wurde aus demselben Fleisch Nähragar nach Huntoon in 2 Serien bereitet; die eine enthielt Pepton, die andere Trypton. Beide wurden in unserem Laboratorium vorbereitet, und zwar das erstere nach Martin, das andere nach Cole-Onslow. Sonst glichen die Serien einander vollständig, das pH von beiden war 7,3. Bei Einsaat mehrerer Stämme der Gonokokken, Meningokokken und *Micrococcus catarrhalis* auf diese Nährböden konnte fast kein Unterschied im Wachstum der Gono- und Meningokokken festgestellt

werden; es schien sogar Peptonagar diesen Mikroorganismen besser zuzusagen als Tryptonagar. Im Gegenteil wuchs *Microc. catarrh.* besser auf Tryptonagar als auf Peptonnährböden. Der Versuch, Pepton durch Nutrose zu ersetzen, war von keinem besonderen Erfolg gekrönt.

Huntoon empfiehlt den Zusatz von Eiern zu seinem Nährboden. Da aber das Ei, insbesondere das Eigelb, den Nährboden trübt, wurden Versuche angestellt, um zu entscheiden, ob die Vorteile dieses Zusatzes groß genug sind, um den erwähnten Nachteil auszugleichen. Ich habe Agar nach Huntoon mit Ei und ohne Ei bereitet, konnte aber keine bedeutenden Unterschiede feststellen. Versetzt man mit Eiern einen gewöhnlichen Nähragar, der trotz optimaler (H') wegen Mangel an vitaminartigen Stoffen für Gonokokkenzüchtung unbrauchbar ist, so genügt dieser Zusatz nicht, das Gonokokkenwachstum zu ermöglichen. Die Substanzen, welchen der Huntoonsche Nährboden seinen Wert verdankt, rühren also gänzlich vom verwendeten Fleisch her.

Um das Optimum der Reaktion zu bestimmen, wurde eine Serie des Huntoonschen Nährbodens in mehrere Teile verteilt, deren jeder auf eine andere Reaktion eingestellt wurde. Zum Alkalisieren wurde zuerst Sodalösung gebraucht, nachdem aber festgestellt worden war, daß die mit Soda eingestellte Reaktion nach der Sterilisation einer bedeutenden Aenderung unterliegt, wurde später nur normale oder 10proz. Natronlauge dazu verwendet. Zum Einsäuern gebrauchte man 10proz. Salzsäure. Die Wasserstoffionenkonzentration wurde teilweise nach Clark, teilweise nach Michaelis (mit dem Komparator und den Indikatoren der Firma Leitz) bestimmt. Die Nährböden wurden in Proberröhrchen als Schrägagar beimpft. Um eine möglichst gleichmäßige Einsaat zu erreichen, wurde eine frische Schrägagarkultur in einer geringen Menge Bouillon verteilt, und von dieser Emulsion wurde je eine Oese auf jedes Röhrchen übertragen. Wenn die Kultur fein verteilt wird und man sich derselben Oese stets bedient, dann ist die Einsaat gleichmäßiger, als wenn man direkt von Agar auf Agar abimpft. Diese Art der Einsaat wurde in allen Kulturreihen angewendet.

Der ansehnlichen Reihe von Experimenten entnehme ich 2 Protokolle, deren eines das Wachstum auf einem guten Huntoon-Nährboden, das andere auf einem minderwertigen darstellt. Die Befunde wurden nach 24 Std. im Brutschrank abgelesen.

+++	bedeutet	reichliches Wachstum,
++	„	schwächeres, aber deutliches Wachstum.
+	„	schwaches, kaum bemerkbares Wachstum (Spuren),
E. K.	„	einzelne Kolonien,
—	„	Wachstumangel,
.	„	das Röhrchen wurde nicht beimpft.

Wenn man nicht ganz geeignete Nährböden beimpft, so erzielt man entweder schwaches, aber gleichmäßiges Wachstum, und solches Verhalten wird mit + bezeichnet, oder aber von zahlreichen übertragenen Keimen kommen nur wenige zur Entwicklung, sie bilden sich aber zu größeren, ansehnlichen Kolonien aus. Dieses Verhalten wird mit E. K. bezeichnet.

Tabelle I.

Stämme	PH								
	6,4	6,7	6,9	7,0	7,1	7,3	7,4	7,6	7,9
Gonoc. R.	—	—	.	.	++	++	.	++	E. K.
„ L.	—	—	—	++	+++	+++	+++	+++	++
„ M.	—	—	E. K.	E. K.	E. K.	++	+++	++	E. K.

Tabelle II.

Stämme	6,7	6,8	7,0	7,1	7,3	7,7	8,1
Gonoc. B.	—	—	—	—	—	—	—
„ Sk.	—	—	—	++	—	—	—
„ Don.	—	—	—	—	++	—	—
„ M.	—	—	—	—	—	—	—
„ Sa.	—	—	—	—	—	—	—
Meningoc. Ros.	+	+	++	++	+	—	—
„ Led.	—	—	++	++	++	+	—
Micr. catarrh.	++	+++	+++	++	++	+	—
Sarcina urogenit.	—	—	++	++	++	++	++

Aus diesen und ähnlichen Tabellen erhellt, daß die Wachstumsgrenzen der Gonokokken auf Huntoonschem Nährboden p_H 6,9 und 7,9 entsprechen. Das Optimum schwankt gegen p_H — 7,3. Es kommen individuelle Unterschiede der einzelnen Stämme vor, die aber unbedeutend zu sein scheinen. Das Optimum für Meningokokken liegt ungefähr bei demselben p_H , vielleicht etwas tiefer. Der Microc. catarrh. unterscheidet sich aber durch eine Wachstumsmöglichkeit bei saurer Reaktion. Eine Sarcina, die aus Urethralesekret reingezüchtet wurde, entwickelte sich bei mehr alkalischer Reaktion sehr gut.

Es kam ferner darauf an, zu erforschen, ob die auf Huntoonschem Nährboden bestimmten Werte auch für andere Nährböden, hauptsächlich für den Aszitesagar, gültig sind. Die Experimente wurden also wiederholt, wobei in einer Versuchsreihe der Nähragar mit 30 Proz. eines menschlichen Exsudates von einem Fall von tuberkulöser Bauchfellentzündung, in einer anderen dagegen mit einer serösen Flüssigkeit aus einer Ovarialzyste versetzt wurde. Die Wasserstoffionenkonzentration wurde zweimal bestimmt, und zwar einmal bei Vorbereitung des Nähragars, das andere Mal nach Zusatz der serösen Flüssigkeit. Selbstverständlich war nur die letztere Bestimmung maßgebend. Im allgemeinen hebt der Zusatz von 25—30 Proz. einer serösen Flüssigkeit das p_H um 0,2. Die Tabelle III gibt ein Protokoll von diesen Experimenten an:

Tabelle III.

Stämme	5,9	6,3	6,8	7,4	7,9	8,3	9,0
Gonoc. F. nach 24 Std.	—	—	—	++	++	—	—
„ „ „ 72 „	—	—	—	++	+++	+	—
„ Jez. „ 24 „	—	—	—	++	++	—	—
„ „ „ 72 „	—	1 Kol.	1 Kol.	++	+++	—	—
„ Kl. „ 36 „	—	—	—	++	++	E. K.	—
„ „ „ 72 „	—	—	—	++	++	E. K.	—
„ Zar. „ 36 „	—	—	—	—	—	—	—
„ „ „ 72 „	—	—	—	—	E. K.	—	—
„ Gr. „ 48 „	—	—	—	—	E. K.	—	—
„ „ „ 72 „	—	—	—	1 Kol.	E. K.	—	—
„ Kap. „ 48 „	—	—	—	++	++	—	—
„ „ „ 72 „	—	—	—	++	++	—	—
„ A. W. „ 24 „	—	—	—	—	+	—	—
„ „ „ 72 „	—	—	—	++	++	++	—
Mngc. Nak. „ 24 „	—	—	++	++	++	—	—
„ „ „ 72 „	—	—	++	++	++	—	—
Micr. cat. „ 24 „	++	++	E. K.	+++	++	—	—
„ „ „ 72 „	++	++	+	+++	++	—	—
„ „ „ 3 „ 24 „	—	++	++	++	++	—	—
„ „ „ 72 „	++	+++	+++	++	++	—	—
„ „ „ M. „ 24 „	—	++	++	++	+	—	—
„ „ „ 72 „	E. K.	++	+++	++	++	—	—

Aus dieser Tabelle erhellt, daß der Zusatz einer serösen Flüssigkeit das Wachstum der Gonokokken in viel mehr alkalischen Nährböden zuläßt, als es ohne Serumzusatz möglich wäre. Die Grenze in der sauren Reihe wird aber gar nicht verschoben. Auch das Optimum verschiebt sich gegen die alkalische Reaktion bis in die Nähe von pH 8,0. Durch diese Verschiebbarkeit der Wachstumsgrenze und des Optimums in Abhängigkeit von der Art des Nährbodens lassen sich am leichtesten die verschiedenen Ergebnisse der einzelnen Forscher erklären. Der *Micrococcus catarrhalis* behält auch bei Serumzusatz die Fähigkeit, auf sauren Nährböden zu wachsen, sein Optimum bleibt bei einer neutralen oder schwach sauren Reaktion.

Huntoon warnt vor hohen Sterilisationstemperaturen und sterilisiert infolgedessen seinen Nährboden nicht im Autoklav, sondern bei $100^{\circ} C$. Da eine solche Sterilisation aber nicht ganz zuverlässig ist, verlängert er die Zeit derselben bis auf etwa 3 Std. Trotzdem ist der Nährboden Huntoons nicht immer keimfrei. Um den Einfluß der Art der Sterilisation auf den Wert des Nährbodens zu bestimmen, wurde eine Serie des Huntoonschen Nähragars in mehrere Teile zerlegt, wovon ein jeder auf eine andere Weise sterilisiert wurde. Die Agarröhrchen wurden nach der Entkeimung schräg gelegt und nach 24 Std. mit Gonokokken, Meningokokken und *Microc. catarrh.* besät. Die Ergebnisse findet man in Tabelle IV.

Tabelle IV.

Der Entkeimung		Gonokokkus				Meningokokkus		Microc. catarrh.
Temperatur	Zeit	K.	D.	Mal.	My ²⁾	R.	L.	
100°	10 Min. ¹⁾	+++	++	++	+	.	.	.
"	20 "	+++	++	.	++	++	.	+
"	30 "	++	++	++	E. K.	++	+++	++
"	1 Std.	++	+	+	"	++	+++	++
"	2½ "	E. K.	E. K.	E. K.	"	++	++	++
116°	5 Min.	+++	++	++	"	++	+++	++
"	10 "	++	++	++	"	++	+++	++
"	20 "	++	+	+	"	++	+++	++
"	30 "	+	E. K.	+	—	++	+++	+++
"	1 Std.	—	—	E. K.	E. K.	++	++	++
126°	10 Min.	++	++	+	—	++	+++	+++
"	30 "	++	+	+	E. K.	++	+++	+++
130°	30 "	++	—	+	1 Kol.	++	++	++
134°	10 "	—	—	++	E. K.	++	++	++

Die Entkeimung bei 100° wurde im Kochschen Apparat, bei höheren Wärmegraden im Autoklav durchgeführt. Die Zeit der Sterilisation wurde von dem Zeitpunkt ab berechnet, in welchem die gewünschte Temperatur erreicht wurde. Es liegt auf der Hand, daß dabei außer der eigentlichen Zeit der Sterilisation noch die Zeit der Erwärmung und Abkühlung der Apparate gewissermaßen berücksichtigt werden muß. Sterilisierte man z. B. 5 Min. lang bei 116° , so war eigentlich der Nährboden etwa 20 Min. lang unter der Einwirkung des gespannten Dampfes, dessen Temperatur 100° überstieg, denn es dauerte etwa 6—8 Min. von dem Momente ab, in dem der Autoklav 100° erreicht hatte, bis zu dem Zeitpunkte, da die Temperatur auf 116° ge-

1) Der Nährboden ist nicht steril, es wachsen auch Saprophyten.

2) Wahrscheinlich starb die Kultur des Gonoc. My, von welcher abgeimpft wurde, früher ab, als andere, deshalb waren beinahe überall nur einzelne Kolonien vorhanden.

stiegen ist. Die Zeit der Abkühlung von 116° bis 100° dauerte ebenfalls ca. 7 Min. Die Erhitzung von 100° auf 126° dauerte etwa 15 Min., die Abkühlung (126°—100°) 10 Min. Die Zeit der Erwärmung schwankte in Abhängigkeit von den Druckschwankungen in Gasröhren.

Aus Tabelle IV erhellt vor allem, daß die Zeit der Entkeimung ein mindestens ebenso wichtiger Faktor ist wie die Temperatur. Wir sehen ferner, daß eine starke Sterilisation den Wert des Nährbodens für die Meningokokken und den *Microc. catarrh.* nur ganz unbedeutend beeinflusst, daß sie dagegen dessen Wert für die Gonokokken bedeutend herabsetzt. Die Entkeimung bei 100° 10—20 Min. lang ergibt ganz gute Nährböden, die aber nicht immer keimfrei sind. Gleichfalls sehr gute Resultate, auch in bezug auf die Sterilität, erreichen wir durch eine 5 Min. dauernde Entkeimung im Autoklav bei 116°. 1 Std. bei 100° setzt den Nährwert des Nährbodens stark herab, eine 2½ Std. dauernde Sterilisation bei 100° ergibt einen Nährboden, der sich für Gonokokkulturen nicht mehr eignet; kaum vereinzelte Kolonien kommen darauf zum Vorschein. Ein Nähragar, der 10 Min. lang bei 126° oder 20 Min. lang bei 116° erhitzt wurde, hat denselben Nährwert, wie derselbe Nährboden nach einstünd. Entkeimung bei 100°. Eine halbe Stunde bei 116° ergibt denselben Effekt wie 2 Std. bei 100° usw. Da die Sterilisation im Autoklav viel sicherer ist und auch Sporen eher durch kurzdauernde Erhitzung auf höhere Temperaturen, als durch eine langdauernde bei 100° abgetötet werden, halte ich die von Huntoon empfohlene 2½stünd. Erhitzung bei 100° nicht für ganz richtig. Huntoon sucht eine Abkürzung der Sterilisation dadurch zu erreichen, daß er die Auflösung von Pepton und Agar mit der Fleischextraktion verbindet. Es scheint mir viel besser, den Grundsatz von Mulsow (26) hier anzuwenden, d. i. separat Fleischbrühe zu bereiten, separat Pepton und Agar aufzulösen und erst zum Schluß beide Lösungen in gleichen Teilen zu vermischen. Auf diese Weise kann man den vitaminartigen Substanzen die ihnen schädliche Erhitzung ersparen, die aber nur zur Agarauflösung in hohem Grade notwendig ist.

Huntoon behauptet, die Filtration durch Papier oder Watte übe einen schädlichen Einfluß auf den Nährboden, indem vitaminartige Substanzen durch Filtrierpapier adsorbiert werden. In einer längeren Versuchsreihe habe ich mich überzeugen können, daß, wenn der Nähragar von Huntoon filtriert wird, was natürlich nur bei einer höheren Temperatur durchführbar ist, sich dessen Nährwert vermindert; wenn wir aber die kalte Fleischbrühe filtrieren, so verliert dieselbe ihren Nährwert dadurch gar nicht. Es liegt also auf der Hand, daß nicht die Adsorption, sondern lediglich die verlängerte Erhitzung eine Verminderung des Nährwertes zur Folge hat.

Die Substanzen, von denen der Nährwert der Nährböden für Gonokokken abhängig ist, sind in ihrem Verhalten den Vitaminen B resp. D gewissermaßen ähnlich. Die Schutzwirkung solcher Nährböden für an Avitaminosen leidende Tiere zu bestimmen und auf diese Weise auf die Identität oder Nichtidentität dieser Substanzen mit den Vitaminen zu schließen, war mir leider unmöglich. Ich habe nur Versuche angestellt, ob man durch Hefe, die bekannterweise an Vitamin B und D besonders reich ist, diese Substanzen ersetzen könnte.

Es stellte sich heraus, daß der Zusatz von Hefe auch einen für Gonokokken untauglichen Nährboden brauchbar macht, falls die Hefezellen, wenn auch abgetötet, in den Nähragar gelangen. Hefeextrakte waren dagegen ganz unwirksam, und zwar sowohl wässrige wie alkoholische (konzentrierter und 50proz. Alkohol), wie auch durch Schwefelsäuredigerierung aus Hefe gewonnene und mit Baryum-Hydroxyd von der Schwefelsäure befreite Extrakte. Die Hefenährböden glichen aber dem Huntoonschen Agar nicht, das Wachstum der Gonokokken war bedeutend spärlicher.

Auf Grund der oben angeführten Experimente möchte ich folgende Darstellung eines für Gonokokken taugenden Nähragars empfehlen: Ein Rinderherzmuskel wird auf die übliche Weise präpariert (d. h. Muskelgewebe wird von Fett und fibrösem Bindegewebe befreit), fein gehackt und zu je 1 kg Fleisch 1 l Wasser zugesetzt, 1—2 Std. bei Zimmertemperatur mazeriert, dann ganz kurz (ca. 5 Min.) gekocht, die Brühe durch Sedimentierung oder Filtration über Filtrierpapier vom Fleisch befreit. Gleichzeitig wird eine 2proz. Peptonlösung vorbereitet und mit $\frac{1}{2}$ proz. Kochsalz und 4proz. Agar-Agar versetzt. Agar wird im Autoklav aufgelöst, wodurch auch die Pepton-Agarlösung absolut keimfrei gemacht wird. Falls das Pepton bei Auflösung oder Sterilisation einen starken Bodensatz bildet, empfiehlt es sich, die Peptonlösung vor Agarzusatz zu filtrieren. Man kann auch die fertige Pepton-Agarlösung filtrieren, was aber meistens überflüssig erscheint. Man kann auch Pepton ganz fortlassen und Agar bloß in einer $\frac{1}{2}$ proz. Kochsalzlösung auflösen. Nun wird die Fleischbrühe mit der noch heißen Agarlösung zu gleichen Teilen vermischt, die Reaktion auf pH 7,3—7,4 mit Normal-Natronlaugenlösung gebracht, sodann mit dem Nährboden sterile Proberöhren oder kleine Fläschchen gefüllt, dieselben im Autoklav bei ca. 110° ($\frac{1}{2}$ Atmosphäre) 15 Min. lang sterilisiert. Noch bessere Resultate werden durch eine 15 Min. lange Sterilisation im Kochschen Dampftopf (ca. 100°) erzielt, der Nährboden ist aber nicht immer keimfrei. Will man sich auf so kurze Entkeimung beschränken, so muß man die Fleischbrühe aseptisch vorbereiten (sterilisierte Fleischmaschine, sterilisierte Töpfe, gekochtes Wasser u. dgl.).

Der Nährboden ist nicht ganz klar und darf nicht filtriert werden. Die Trübung ist aber nicht bedeutend; es sammelt sich, falls der Agar in kleinen Gefäßen gehalten wird, bald ein geringer Bodensatz, von dem man den Nähragar nach Verflüssigung leicht durch Dekantation befreien kann.

Auf solchem Agar gedeihen Gonokokken auch ohne Serumzusatz, und zwar wachsen Stämme, die schon auf künstlichen Nährböden gezüchtet wurden, stets, bei Aussaat eines gonokokkenenthaltenden Eiters wachsen dieselben fast immer heraus. Das Wachstum ist aber bedeutend stärker, wenn wir Serum zusetzen. Es wäre gewiß ein Irrtum bei Anfertigung von Wertheimschem Serumagar, die Zusammensetzung des Agars nicht zu berücksichtigen, da man durch Serumzusatz nicht jeden Agar in einen für Gonokokken guten Nährboden umzuwandeln vermag.

In 7 Fällen wurde gonokokkenenthaltender Eiter parallel auf 3 Nährböden ausgestrichen, und zwar:

1) auf Serumagar nach Wertheim, der auf übliche Weise vorbereitet wurde, d. h. Fleischbrühe im Autoklav bei 120° sterilisiert, durch Filtrierpapier filtriert, Pepton und Kochsalz zugesetzt, Bouillon abermals im Autoklav sterilisiert, Agar (2 Proz.) aufgelöst, mit Sodalösung bis zu einer schwach gegen Lackmus alkalischen Reaktion alkalisiert, der Nähragar durch Papier filtriert, nochmals im Autoklav entkeimt, zuletzt eine Exsudatflüssigkeit von tuberkulöser Pleuritis zugesetzt.

2) auf Nährboden nach Huntoon,

3) auf Nährboden nach Huntoon mit derselben Exsudatflüssigkeit wie unter 1. In allen Fällen war die Kultur positiv auf dem Nährboden von Huntoon, gleichviel ob mit oder ohne Serumzusatz, nur war ihr Wachstum auf dem Nährboden nach Huntoon mit Serumzusatz viel üppiger, sowohl was die Zahl als auch die Größe der Kolonien anbelangt; dagegen war die Kultur auf dem gewöhnlichen Serum-(Exsudat)-Agar nur 4mal positiv und 3mal negativ. Nach diesem Experiment wurde zur Gonokokkenisolierung aus Krankenmaterial nur der Huntoonsche Nährboden verwendet, entweder

genau nach Vorschrift oder in meiner oben angegebenen Modifikation mit Zusatz eines Trans- oder Exsudates. Bei Anwendung dieses Nährbodens habe ich in 55 Fällen, wo Gonokokken mikroskopisch nachweisbar waren, dieselben auch herausgezüchtet; in 6 Fällen war die Kultur positiv dort, wo eine 15 Min. lange Durchmusterung der Präparate die Gonokokken nicht nachzuweisen vermochte, und nur einmal war die Kultur negativ dort, wo das Präparat ein positives Ergebnis geliefert hatte. Das Material wurde stets auf der Oberfläche der in Petri-Schalen gegossenen Nährböden ausgestrichen und nie (wie es Wertheim ursprünglich empfohlen hatte) mit dem flüssigen Nährboden vermischt.

Ich stehe auf dem Standpunkte, daß die Arbeiten Huntoons, Coles, Levinthals u. a. keineswegs den Wert des Wertheimschen Grundsatzes herabsetzen, aber man sollte sich die oben zitierten Arbeiten mitunter zunutze machen, und zwar mehr auf die erste Komponente des Wertheimschen Nährbodens achten, besonders aber auf die richtige Reaktion und auf den Gehalt von vitaminartigen Substanzen einen großen Wert legen. Was die zweite Komponente des Wertheimschen Serumagars anbelangt, so ist es allgemein bekannt, daß Wertheim zuerst Menschenserum dem Agar zusetzte, und daß später das Blutserum durch andere seröse Flüssigkeiten, hauptsächlich durch Aszites, ferner Hydrozele- oder Hydrothoraxflüssigkeiten ersetzt wurde. Anstatt Transsudate werden häufig Exsudate hauptsächlich von tuberkulöser Rippenfell- oder Bauchfellentzündung angewendet. Die letzteren tuberkulösen Exsudate werden sogar viel öfter als Aszites angewendet, nur schreibt man wenig davon. Die Tuberkelbazillen, die in solchen Exsudaten vorkommen können, stören hier gar nicht, weil ihr Wachstum auf dem Wertheim-Serumagar nie ersichtlich wird; und sollte dies ausnahmsweise vorkommen, so wäre es erst lange Zeit nach dem Erscheinen der Gonokokkenkultur möglich, ja sogar in dem Momente, wo die Gonokokken bereits abgestorben wären. Höchstens könnte bei Zubereitung von Impfstoffen der Gebrauch tuberkulöser Flüssigkeiten Bedenken wecken.

Was den Gebrauch der serösen Flüssigkeiten anbelangt, so erheischen hier folgende Fragen ihrer Lösung. 1. Haben verschiedene Flüssigkeiten gleichen Nährwert für Gonokokken? 2. Von welchen Bestandteilen ist der Wert der serösen Flüssigkeiten abhängig? 3. Welches Verhältnis des Serums zum Agar weist die besten Resultate auf? 4. Taugen Sera ohne Bestandteile des Nähragars für Gonokokkenzüchtung? 5. Welchen Einfluß üben verschiedene Sterilisations- und Konservierungsmethoden auf den Nährwert der Sera für Gonokokken?

Die erste Frage wurde schon von mehreren Autoren (Scholtz, Laitinen, zit. nach Koch) beantwortet, und zwar in dem Sinn, daß einzelne Körperflüssigkeiten in bezug auf ihren Nährwert ansehnliche Differenzen wahrnehmen lassen. In meinen Untersuchungen habe ich 14 Flüssigkeiten miteinander verglichen, indem dieselben mit einem Nähragar vermischt wurden, auf welchem trotz optimaler Wasserstoffkonzentration mangels vitaminartiger Substanzen Gonokokken ohne Serumzusatz sicher nicht wachsen konnten. Unter diesen Flüssigkeiten waren 11 Exsudate aus Pleuritis oder Peritonitis tuberculosa-Fällen (1, 2, 3, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 15), eine (Nr. 14) war der Inhalt einer Ovarialzyste, zwei (8 und Z) waren echte Aszitesflüssigkeiten. Eiweißgehalt wurde refraktometrisch bestimmt. Jede von diesen Flüssigkeiten war zur Umzüchtung von schon isolierten Stämmen tauglich, für die Herauszüchtung der Gonokokken auf Menschenmaterial erwiesen sich nicht alle als geeignet. Die Untersuchungen wurden derart angestellt, daß Teile von demselben Nähragar separat mit verschiedenen Flüssigkeiten in demselben Verhältnis

vermischt und in Petri-Schalen gegossen wurden. Nach Erkalten wurde gonokokkenenthaltendes Material aufgestrichen. Von jedem Patienten wurde Eiter auf mehrere (durchschnittlich 5—6) Schalen ausgesät, jede Schale enthielt eine andere seröse Flüssigkeit. Die Ergebnisse sind in Tabelle V zusammengestellt.

Tabelle V.

Seröse Flüssigkeit Nr.	Eiweißgehalt in Proz.	Zahl der unter- suchten Fälle	Zahl der positiven Er- gebnisse	Positive Er- gebnisse in Proz.
1	3,57	7	2	29
2	5,02	9	8	89
3	4,64	4	4	100
6	1,38	2	1	—
7	4,54	6	4	67
8 unerhitzt	0,4	3	3	100
8 bei 56° ½ Std. inaktiviert	0,4	5	2	40
9	5,78	3	0	.
10	4,85	3	3	.
11	?	7	6	86
12	4,8	8	8	100
13	3,3	6	5	83
14	0,89	6	4	67
15	2,66	6	6	100
Z.	0,48	14	12	86

Tabelle V beweist, daß nicht alle Flüssigkeiten sich in gleicher Weise für die Gonokokkenkultur eignen. Ich sehe von den Flüssigkeiten Nr. 6, 9, 10 ab, weil sie viel zu spärlich angewendet wurden, und möchte nur auf Flüssigkeit Nr. 1 (wenig tauglich) und Nr. 12 (vorzüglich) hinweisen; dazwischen eine Anzahl intermediärer Werte. Der Eiweißgehalt ist dafür nicht maßgebend. Wir sehen Transsudate mit geringem, nicht einmal ½ Proz. erreichendem Eiweißgehalt, die ebenso für Gonokokkenzüchtung geeignet waren, wie Exsudate mit 10mal höherem Eiweißgehalt.

Wenn wir aber das Minimum des Serumzusatzes bestimmen, welcher schon die Züchtung der Gonokokken ermöglicht, so läßt sich doch eine bestimmte Abhängigkeit des Minimums vom Eiweißgehalt bemerken. Wenn ein Transsudat mit 0,48 Proz. Eiweißgehalt angewendet wurde, so erreichten wir positive Ergebnisse erst bei 20 Proz. Transsudatgehalt, mit einem Exsudat mit 4,8 Proz. Eiweißgehalt konnten dieselben Resultate schon bei einem 2proz. Exsudatgehalt erzielt werden.

Ferner wurde versucht, ob das Wachstum der Gonokokken auf serösen Flüssigkeiten ohne Nähragar möglich ist. Zu diesem Zwecke wurden Transsudat Nr. 8 und Exsudat Nr. 7 in sterile Röhrchen aseptisch verteilt und mit frischen Gonokokkenkulturen besät. Das Wachstum blieb aber aus. Ferner wurden 30 g Agar-Agar und 5 g Kochsalz in 1 l (Leitungs-)Wasser aufgelöst (ohne Fleischbrühe und ohne Pepton) und dieser Wasser„agar“ separat mit den serösen Flüssigkeiten 1, 13, 14, 15, Z zu gleichen Teilen in keimfreien Röhrchen vermischt und diese schräg gelegt. Nach 24 Std. wurden die Nährböden mit frischen Gonokokken-, Meningokokken- und Micrococcus catarrh.-Stämmen beimpft; das Wachstum der Gonokokken blieb überall aus; manche Flüssigkeiten waren dagegen für Meningokokken- und Microc. catarrh.-Züchtung geeignet. Wenn man in 1proz. Peptonwasser (gebraucht wurde Pepton

Witte) 3 Proz. Agar-Agar auflöst und dieses Peptonagar (ohne Fleischbrühe) auf dieselbe Weise mit serösen Flüssigkeiten vermischt, so bleibt das Wachstum der Gonokokken ebenfalls aus.

Diese Experimente beweisen, daß seröse Flüssigkeiten allein für Gonokokkenzüchtung absolut untauglich sind. Dazu sind näher nicht bestimmbar Substanzen, die im Fleisch enthalten sind, unbedingt notwendig. Das Ergebnis dieser Untersuchungen liefert einen überzeugenden Nachweis für den hervorragenden Wert einer richtigen Zusammensetzung des Nähragars als Komponente des Wertheimschen Serumagars.

Die Frage, an welche Bestandteile der Nährwert der serösen Flüssigkeiten gebunden ist, bleibt einstweilen unentschieden. Aus den obigen Untersuchungen ersieht man, daß der Eiweißgehalt eine gewisse Rolle dabei spielt, doch für den Wert der Flüssigkeit nicht ausschließlich maßgebend ist. Es wurde ferner versucht, ob der Fettgehalt nicht eine gewisse Rolle dabei spielt. Ein Exsudat wurde 24 Std. lang mit Aether ausgezogen (öfters geschüttelt); der Aether wurde vom Serum abpipettiert und im Brutschrank abgedampft. Es zeigte sich, daß die auf diese Weise entfettete Flüssigkeit ihren Nährwert für Gonokokken vollständig bewahrt hat, während durch Aether ausgezogene Fettkörper, nach Entfettung des Aethers mit Agar vermischt, keinen Nährwert zeigten. Es liegt auf der Hand, daß Aether nicht alle Fettkörper ausziehen konnte, ich mußte aber auf Zusatz stärker wirkender Mittel (Zusatz von Säure bei der Extraktion) verzichten, weil dadurch auch Eiweißkörper in höherem Grade geschädigt würden. Es wäre wohl anzunehmen, daß der Nährwert der verschiedenen serösen Flüssigkeiten für Gonokokken von ihrem Gehalt an vitaminartigen Substanzen abhängig ist, doch war es mir leider wegen Tiermangels unmöglich, das Problem experimentell zu lösen.

Es wurde ferner untersucht, welchen Einfluß verschiedene Konservierungsmethoden auf seröse Flüssigkeiten ausüben. Es liegt auf der Hand, daß aseptisch gewonnene Sera ohne jeglichen Zusatz die besten Resultate liefern müssen, und solche wurden auch in den bisher angegebenen Untersuchungen vorzugsweise gebraucht. Man stößt aber öfters bei solcher aseptischen Aufbewahrung der Sera auf gewisse Schwierigkeiten, deshalb wurden auch verschiedene Methoden angegeben, dieselben keimfrei zu erhalten. Zu meinen Untersuchungen wurden von den physikalischen Methoden Erhitzung und Filtrierung, von den chemischen dagegen Säure- und Chloroformzusatz berücksichtigt. Erhitzung über 70° koagulierte das Serumeiweiß, deshalb darf man die serösen Flüssigkeiten nicht höher als auf 60° erwärmen. Eine derartige schwache, etwa $\frac{1}{2}$ Std. dauernde Erwärmung des Serums schädigt nur in geringem Grade den Nährwert des Nährbodens. Filtrierung durch Berkefeld- oder Chamberland-Kerzen ist ebenfalls belanglos; auch Chloroform eignet sich gut zur Konservierung der Sera. Säure ist aber dazu weniger geeignet, weil die Säuerung in solcher Konzentration eine Koagulation der Eiweißstoffe hervorruft, die noch nicht imstande ist, eine antiseptische Wirkung zu entfalten.

Es ist bemerkenswert, daß steriler Eiter (z. B. aus kalten Abszessen gewonnen) für Gonokokkenzüchtung ganz untauglich ist, und daß man seröse Flüssigkeit durch Eiter nicht ersetzen kann.

Auch Blutzusatz gibt keine besseren Resultate, wie Exsudatzusatz. Zum Vergleich wurde derselbe Nähragar in besonderen Kölbchen mit Exsudatflüssigkeit, Blut (frisches Menschenzitrablut), mit Blutkörperchen und mit Blutplasma vermischt, vom Exsudat wurde 30 Proz. hinzugefügt, von den übrigen Zusätzen nur 10 Proz. Die Ergebnisse nach 48stünd. Bebrütung stellt Tabelle VI dar:

Tabelle VI.

Krankensekret	Nähragar allein	Mit Zusatz von		Blutkörperchen	Blutplasmen
		Exsudat	Blut		
H.	+	++	++	—	.
Sz.	.	++	—	.	.
A.	—	++	+	++	++
Z.	—	++	—	—	—
Jez.	.	++	—	.	.
Ol.	+	+	—	.	.

Blutagar ist dabei undurchsichtig, weshalb seine Anwendung für die Isolierung der Gonokokken nicht empfohlen werden kann.

Der Nährboden von Levinthal ist von dieser Eigenschaft frei. Dieser Nährboden wurde auf folgende Weise zubereitet: Ein gewöhnlicher 2proz. Nähragar wird auf pH 7,3—7,4 eingestellt. Nach der Sterilisation im Autoklav wird er auf 60° abgekühlt, dann mit 10 Proz. Hammel- oder Pferdeblut (ausnahmsweise mit Menschenblut) versetzt, zuletzt nach Durchmischung 5 Min. lang bei 100° gekocht und in erwärmten Gefäßen auf einer großen Zentrifuge kurze Zeit scharf zentrifugiert. Der ganz klare Nährboden wird nun rasch abpipettiert und in sterile Röhrchen oder kleine Fläschchen gefüllt.

Die Befunde waren nicht stets gleich. So wie mit Huntoonschem Nährboden, wurden auch bei Anwendung des Levinthalschen Agars Serien gewonnen, die sich zur Züchtung der Gonokokken aus Krankenmaterial vorzüglich eigneten; bisweilen bekam man bei anscheinend derselben Technik viel schlechtere Serien. Wird dem Levinthalschen Blutagar Aszitesflüssigkeit hinzugefügt, so wird dessen Nährwert bedeutend erhöht; der Durchmesser einiger isoliert stehender Kolonien ist etwa 3mal so groß wie derjenigen, die auf demselben Nährboden und ebenso lang, aber ohne Asziteszusatz, gezüchtet werden.

Die Isolierung von Gonokokkenstämmen geschieht am besten in Petri-Schalen. Wohl ist es möglich, auf Aszites-schrägagar dasselbe Ziel zu erreichen, aber nur dann, wenn der Eiter gonokokkenreich ist. Falls aber nur eine geringe Zahl von Gonokokken in einem stark mit anderen Mikroben verunreinigten Material vorkommt, so ist es entschieden ratsamer, sich der Petri-Schalen zu bedienen. Dann ist aber für genügende Feuchtigkeit zu sorgen. Zu diesem Zwecke muß der Nährboden genug Wasser enthalten, der Gehalt an Agar-Agar soll im fertigen Aszitesagar 2 Proz. nicht übersteigen. Das Kondensationswasser muß abgedampft werden, denn ist die Agaroberfläche damit reichlich bedeckt, so haben saprophytische Bakterien Gelegenheit, im Kondensationswasser wie in einem flüssigen Nährboden die ganze Oberfläche zu bewachsen, so daß die Gonokokkenkolonien dann gar nicht zum Vorschein kommen. Das Wasser, welches sich aber auf dem Schalendeckel gewöhnlich kondensiert, soll man wohl belassen, denn es sättigt dann die Atmosphäre mit Wasserdampf. Sammelt sich aber im Deckel kein Wasser, so empfiehlt es sich, breite Streifen feuchten Filtrierpapiers hineinzulegen, da dieselben der Austrocknung des Nährbodens vorbeugen.

Zusammenfassung.

1) Die Züchtung der Gonokokken ist eine recht schwierige Aufgabe, besonders wenn sie zu diagnostischen Zwecken herangezogen wird, und wenn man negative Befunde für Heilungsatteste verwerten will. Um auch geringe Zahlen der Gonokokken, auch solche, die sich durch eine etwa viertelstündige

Durchmusterung der Präparate nicht mikroskopisch nachweisen lassen, mit Hilfe des Kulturverfahrens aufdecken zu können, muß man an die Nährböden besondere Anforderungen stellen, da nur der allerbeste Nährboden als gut genug für diesen Zweck betrachtet werden kann. — 2) Als bester Nährboden gilt der Wertheimsche Serumagar und zwar mit Recht, aber nur unter der Bedingung, daß dessen Bestandteile nach besonderen Vorschriften zielbewußt bereitet und geprüft werden. Im allgemeinen kann hier der Grundsatz gelten, daß man mit Hilfe dieses Nährbodens nur dann vorzügliche Resultate in allen geprüften Fällen erzielt, wenn seine erste Komponente, d. h. der Nähragar, für die Züchtung der meisten Gonokokkenstämme auch ohne Serumzusatz taugt. — 3) Damit der Nähragar dieser Anforderung entspricht, muß er erstens eine optimale Wasserstoffionenkonzentration enthalten, zweitens einen gewissen Gehalt an nicht näher definierbaren, vitaminartigen Stoffen aufweisen. — 4) Die optimale Wasserstoffionenkonzentration liegt bei pH 7,3, wenn der Agar ohne Serum verwendet wird, und bei pH 7,5—7,6, wenn Serum zugefügt wird. Da der Zusatz einer serösen Flüssigkeit zum Nähragar im Verhältnis 1:3, dessen pH um ca. 0,2 erhöht, so ist der Nähragar in jedem Fall auf pH 7,3—7,4 einzustellen. — 5) Um dem Agar einen genügenden Gehalt an vitaminartigen Stoffen zu sichern, muß man Fleisch von Tieren verwenden, die mit frischem vitaminreichen Futter (auf der Weide) ernährt wurden. Deshalb gewinnt man bei gleicher Technik bessere Nährböden im Sommer als im Winter. Dadurch lassen sich auch Schwankungen im Nährwert des Agars erklären. Die besten Resultate erzielt man bei Verwendung von Herzmuskel und Milz, dann folgen Leber, Niere. Auch Hoden und Hirn liefern ziemlich gute, jedoch trübe und manchmal gallertartige (Hoden-) Brühen. — 6) Pepton hat nur geringe Bedeutung für das Wachstum der Gonokokken, denn auch ohne Pepton lassen sich sehr gute Nährböden für diese sonst so anspruchsvollen Mikroben herstellen. — 7) Soll der Nähragar die genannten vitaminartigen Stoffe enthalten, so sind am besten die Weisungen von Huntoon oder Cole-Lloyd und Levinthal zu befolgen. — 8) Die besten Ergebnisse liefert der modifizierte Nährboden von Huntoon. Ausführliche Vorschrift und deren experimentelle Begründung im Text. — 9) Gelingt es, vitaminreiche Stoffe in den Nähragar einzuführen, so sind sie dort längere Zeit haltbar. — 10) Die als zweite Komponente des Wertheimschen Serumagars gebrauchten serösen Flüssigkeiten sind allein, d. h. ohne Extraktivstoffe aus Fleisch, für Gonokokkenzüchtung untauglich. — 11) Die serösen Flüssigkeiten unterscheiden sich bedeutend voneinander in bezug auf ihren Nährwert für Gonokokken. Sie sind deshalb genau zu überprüfen, bevor sie zu diagnostischen Zwecken verwendet werden. Für den Nährwert derselben ist nicht ausschließlich ihr Eiweißgehalt maßgebend, denn man erzielt öfters bessere Resultate mit eiweißarmen Transsudaten als mit eiweißreichen Exsudaten. — 12) Blut als Zusatz steht an Wirkung den serösen Flüssigkeiten nach, auch ist steriler Eiter (aus kalten Abszessen) als Ersatz für Aszitesflüssigkeit unbrauchbar. — 13) Die Nährböden von Huntoon, Levinthal u. dgl. sind womöglich noch mit Zusatz einer

serösen Flüssigkeit für diagnostische Zwecke zu gebrauchen. — 14) Bei Anlegung von Kulturen in Petri-Schalen ist für genügende Feuchtigkeit zu sorgen.

Literatur.

1. Bumm, Centralbl. f. Bakt., Bd. 1. S. 19. — 2. Wertheim, Arch. f. Gynäkol., Bd. 42. 1892. S. 1. — 3. Jos. Koch, in Kolle-Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg., 2. Aufl., Bd. 4. S. 674. — 4) Ghon u. Schlagenhauser, Wien. kl. Wochenschr., 1893. Arch. f. Derm. u. Syph., Bd. 28. — 5) Thalmann, Centralbl. f. Bakt., Orig., Bd. 27. 1900. S. 828; Bd. 31. 1902. S. 678. — 6) Strömberg, Russ. Journ. f. Haut- u. Geschlechtskrankh., Bd. 2. Nr. 9. 1901, zit. nach Thalmann. — 7) Brongersma u. van de Velde, Centralbl. f. Bakt., Abt. 1. Bd. 33. 1903. — 8) Picker, Wien. klin. Wochenschr., 1906. Nr. 43. — 9) Baermann, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 43. S. 528, zit. nach Centralbl. f. Bakt., Abt. 1. Ref. Bd. 34, S. 19. — 10) Rothmann, Wratsch. 1905. Nr. 28, zit. n. Jos. Koch. — 11) Alfén, Hygiea, 2. Folge. Bd. 6. 1904. Nr. 2, zit. n. Jos. Koch. — 12) Jeckstadt, (Diss.) Königsberg 1904, zit. n. Jos. Koch. — 13) Kutscher, Berl. klin. Wochenschr., 1909. Nr. 46. S. 2059. — 14) Cole a. Lloyd, Journ. of. Pathol. a. Bact., Vol. 21. 1917. p. 267. — 15) Erickson a. Albert, Journ. of inf. Dis., Vol. 30. 1922. p. 268. — 16) Heden, Acta Dermato-Vener., T. 1. 1920. p. 198. — 17) Torrey a. Buckell, Journ. of inf. Dis., Vol. 31. 1922. p. 125. — 18) Huntoon, Journ. of. inf. Dis., Vol. 23. 1918. — 19) Lorentz, Centralbl. f. Bakt., Abt. 1., Orig., Bd. 93. S. 467. — 20) Torahiko Ikoma, Centralbl. f. Bakt., Abt. 1., Orig., Bd. 92. S. 61. — 21) Schäffer, zit. n. Jos. Koch. — 22) Levinthal, in Buschke-Langers: Lehrbuch d. Gonorrhoe, Berlin 1926. — 23) Hart, Steenbock a. Ellis, Journ. of. biol. Chem., Vol. 42. 1920. p. 383, zit. nach Fuk: Die Vitamine, 3. Aufl., München 1924. — 24. Hoagland, zit. nach Funk: Die Vitamine. — 25) Lawryniewicz, Prace Komisji lek. Pozn. Tow. Przyj. Nauk., T. 2. Z. 4. 1924. — 26) Mulsow, Journ. of inf. Dis., Vol. 36. 1925. Nr. 4. p. 419.

Nachdruck verboten.

Beweist die Mäusepathogenität der aus Ascoli-positiven Häuten gezüchteten Milzbrandstämme etwas für die Gefährlichkeit solcher Häute?

Von Prof. Dr. **Kurt Schern**, Montevideo.

Die positive Ascoli-Reaktion bei Milzbrandhäuten zeigt die Gegenwart von Milzbrandantigen an. Jedoch gibt sie darüber keine Auskunft, ob die in einer solchen Haut vorhandenen Keime eine solche Virulenz besitzen, daß sie für Menschen und unsere in der Wirtschaft verwendeten Nutztiere gefährlich sind.

Kraus hat gezeigt, daß in der Regel nur solche Milzbrandstämme Haustiere zu infizieren vermögen, welche Kaninchen töten, wobei er als Virulenzskala die von Pasteur festgestellten Tatsachen benutzt.

Von diesem Gesichtspunkte aus habe ich Mäuse mit Stämmen der Milzbrandvakzine Pasteur I und andere mit Milzbrandvakzine Pasteur II infiziert. Sie starben in der üblichen Zeit, und ihre Organe usw. gaben positive Ascoli-Reaktion.

Ferner ist eine Anzahl von Meerschweinchen mit Stämmen von Vakzine Pasteur II infiziert, und nach ihrem Tode sind die Häute und Organe in der bekannten Weise nach Ascoli untersucht worden. Auch dieses Material reagierte stets Ascoli-positiv.

Danach sind Mäuse, Meerschweinchen, Kaninchen mit hochvirulenten Stämmen, welche aus spontan, an Milzbrand verendeten großen Haustieren

herrührten, infiziert und nach ihrem Tode nach Ascoli untersucht worden. Auch das von ihnen stammende Material reagierte positiv. Auch ein Schaf ist mit einer Dosis Vakzine Pasteur gespritzt worden, welche die übliche Impfdosis übertraf (künstlicher Impffehler). Das Schaf litt außerdem noch an einer anderen Krankheit. Es verendete, und ein Extrakt seiner Haut in getrocknetem Zustande zeigte gut positive Ascoli-Reaktion.

Daraus geht hervor, daß die Ascoli-Reaktion in Ländern, in denen Milzbrandimpfungen in großer Zahl ausgeführt werden, hinsichtlich eines Urteils über die Infektionstüchtigkeit einer Ascoli-positiven Haut für Menschen und Haustiere mit großer Vorsicht bewertet werden muß. Wenn auch an den Häuten der genannten Länder bakteriologisch oder durch den Mäuseversuch Milzbrandkeime nachgewiesen werden, so beweist das noch nichts für die Infektionstüchtigkeit der fraglichen Häute gegenüber Menschen und größeren Haustieren.

Nur die Virulenzbestimmung der aus solchen Häuten gezüchteten Milzbrandkeime am Kaninchen (danach an Meerschweinchen oder Mäusen eventuell) lehrt uns, ob der auf Grund der Ascoli-Reaktion ausgesprochene Milzbrandverdacht berechtigt ist oder nicht im Sinne der vorstehenden Ausführungen.

Diese haben auch Bedeutung für solche Länder, welche dauernd Häute aus Gegenden einführen, wo Milzbrandimpfungen ständig ausgeführt werden. Denn auch im Zusammenhang mit diesen Impfungen sterben Tiere, und im Falle einer Bakteriämie durch die eingepflichten Bakterien geschieht es, daß die Häute solcher Tiere später Ascoli-positiv sind. Züchtet man aus solchen Häuten die Milzbrandkeime und prüft sie an Mäusen, Meerschweinchen und Kaninchen, so infizieren sie entsprechend der bei der Impfung verwendeten Vakzine gemäß der Virulenz von Pasteur I oder II usw. Mäuse oder Meerschweinchen, aber nicht Kaninchen.

Es wäre eine Ungerechtigkeit, solche Häute zu konfiszieren, und es würde nicht der bakteriologischen Wissenschaft entsprechen, in solchen Fällen nur den Mäuseversuch die Entscheidung treffen zu lassen.

Die Aufspaltung des Begriffes „Milzbrand“ in zwei Teile muß vorgenommen werden. Man wird in dieser Beziehung der Kaninchenvirulenz die entscheidende Rolle zukunfts und von kaninchenvirulentem und kaninchen-avirulentem Milzbrand sprechen müssen.

Bei der Untersuchung überseeischer getrockneter Häute auf Milzbrand darf man deshalb nicht so vorgehen, wie es zurzeit in Preußen geschieht, sondern das Verfahren muß sich folgendermaßen gestalten:

- 1) Orientierende Untersuchung der fraglichen Häute mit Hilfe der Präzipitation nach Kraus-Ascoli.
- 2) Ascoli-positive Häute sind auf die Gegenwart kaninchenvirulenter Keime zu untersuchen.
- 3) Sind die herausgezüchteten Keime kaninchenvirulent, so ist die fragliche Haut zu beanstanden.
- 4) Sind die herausgezüchteten Keime nicht kaninchenvirulent, sondern nur mäuse- oder meerschweinchenvirulent, so liegt kein Grund vor, die Häute zu beanstanden.

Nachdruck verboten.

Bemerkung zu Veröffentlichungen über die sog. Pseudobakteriophagie bei Milzbrandbazillen; zugleich Beitrag zur Frage der Variation des Milzbrandbazillus.

Von Prof. **Wl. Markoff**, Sofia.

In letzter Zeit ist in der Literatur wiederholt über die sogenannte Pseudobakteriophagie bei Milzbrandbazillen berichtet worden. Als erster machte Pesch die Mitteilung, daß ihm unter alten Sammlungskulturen ein 10jähriger Milzbrandlaboratoriumsstamm aufgefallen sei, dessen Herkunft unbekannt war. Auf der photographischen Aufnahme, die er von dieser Kultur gibt, zeigte die Bakterienrasse viele, scharf umschriebene, kreisrunde Löcher verschiedener Größe, die viel durchsichtiger waren, als die übrige opake Strichkultur. Seiner Meinung nach waren diese Flecken „Taches vierges“ im Sinne von d'Herelle.

Um die Frage zu klären, impfte Pesch sowohl von den helleren als auch von den opaken Stellen auf frische Nährböden ab. Dabei traten 2 verschiedene Kolonietypen zutage, die sich zunächst in ihrer Durchsichtigkeit unterschieden; außerdem aber zeigten die hellen Kolonien die gewöhnliche, schön gelockte Milzbrandform, während die undurchsichtigen Kolonien mehr rund und kraus-kopfförmig waren.

Pesch glaubt, mit dieser Feststellung den Nachweis dafür erbracht zu haben, daß es sich bei dieser merkwürdigen Aufhellungserscheinung nicht um eine bakteriophage Wirkung, sondern um ein Variationsphänomen handelt.

Katzu, der von Prof. Bail 2 ältere Schrägagarkulturen von Milzbrand erhalten hatte, von denen die eine als „Vakzine“, die andere als „virulent“ bezeichnet war, hat bei der Ueberimpfung auf frische Nährböden ähnliche Erscheinungen wie Pesch festgestellt. Die Arbeit enthält ebenfalls photographische Aufnahmen.

Katzu erklärt die Aufhellungserscheinungen im Gegensatz zu Pesch folgendermaßen: „Es liegt vielmehr zweifellos ein Verlust an Masse, eine Auflösung schon gebildeter Substanz vor, vielleicht vorangegangen vor einer Art Hypertrophie, mit der die knopfartigen Auflagerungen verglichen werden könnten. Impft man von den Knöpfen ab, noch ehe sie sich zu Löchern umgewandelt haben, so erhält man wieder das beschriebene „Wachstum“. Ferner bemerkt Katz: „Es ist sehr wahrscheinlich, daß die erhöhte Temperatur von 42° C auf das Auftreten von Löchern Einfluß hat.“

Ich will hier noch auf die Arbeit von Brown und Basaka über Pseudobakteriophagie des *Bacillus anthracis* hinweisen. Leider steht mir die Originalarbeit nicht zur Verfügung, aber aus dem Referat läßt sich ersehen, daß die Autoren mit einer Schrägagarkultur eines alten Sammlungsstammes von Milzbrandbazillen zu tun hatten. Sie fanden Bakteriophagenlöcher vor-täuschende Flecken, oft mit kleinen sekundären Kolonien vermischt. Die durchsichtigen Flecken waren Kolonien, die hauptsächlich nichtsporentragende Bazillen enthielten.

Bezüglich der erwähnten Arbeiten von Pesch, Katz und Brown und Basaka sei es mir gestattet, auf eine frühere Veröffentlichung von mir selbst hinzuweisen. Ich stellte meine Versuche an 53 Milzbrandstämmen an. Dabei fiel mir auf, daß unter den Milzbrandbazillenstämmen, die längere Zeit in Gelatine kultiviert waren, Varietäten vorkamen, die in gewöhnlichem Nähragar

zwei verschiedene Arten von Kolonien bildeten: Neben kleinen, rundlichen Kolonien mit dichterem Rande kamen hier ziemlich große, „durchsichtige“ Kolonien vor. Die ersteren, d. h. die kleinen Kolonien, waren leichter in einer Emulsion zu verteilen als die großen Kolonien. Die runden Kolonien enthielten vorwiegend kurze Ketten mit reichlichen Sporen, sie wiesen auch sekundäre und tertiäre Kolonien auf. Die großen Kolonien enthielten lange Fäden, die fast sporenlos waren. Diese Erscheinungen kamen nur der Kultur 34 zu und wurden bei weiterer Verimpfung auf gewöhnlichem und auf Blutagar durch 10 Generationen in unveränderter Weise festgehalten, indem sich aus den kleinen Kulturen immer wieder kleine und aus den großen durchsichtigen immer wieder große durchsichtige Kulturen entwickelten. Unter den übrigen 52 Milzbrandstämmen bildete keiner zweierlei („durchsichtige“ und „weiße“) Kolonien.

Der Umstand, daß der erwähnte Stamm 34 längere Zeit auf Gelatine gezüchtet war, erweckte in mir die Vermutung, daß speziell ältere Milzbrandgelatine-kulturen diese Erscheinungen aufweisen könnten. In der Tat ergaben meine Untersuchungen in dieser Richtung, daß unter 20 Milzbrandgelatine-kulturen, die über 2 Monate alt waren und im Eisschrank aufbewahrt gewesen, 8 Stämme die Erscheinungen aufwiesen. Die Erscheinungen bestanden darin, daß aus einer alten Milzbrandgelatinekultur, die auf Agar übergeimpft wurde, sich stets zwei verschiedene Typen von Milzbrandkolonien entwickelten. Meine Untersuchungen ergaben ferner, daß die neuentstandenen Varietäten eine große Vererbungskraft besaßen. Bemerkenswert war auch, daß sich nur aus den weißen Kolonien die „durchsichtigen“ entwickelten, aber nicht umgekehrt.

Aus den hier angeführten Zitaten meiner früheren Arbeiten ist zu ersehen, daß die in den letzten Jahren von Pesch, Katzu und Brown und Basaka über die „durchsichtigen“ und „opaken“ Milzbrandbazillenkolonien gemachten Beobachtungen nicht etwa neue Daten sind.

Eine völlig andere Erklärung dieser Erscheinungen gibt der ungarische Forscher Darányi. Nach ihm ist die Bildung der „Taches vierges“ in den Milzbrandbazillenkulturen als ein fermentativer lytischer Prozeß aufzufassen. Diesen Schluß zieht er aus dem Umstande, daß die „Taches vierges“ und die sekundären Kolonien in der Nähe des Kondenswassers der Agarkulturen gebildet werden. Er meint die primär entstandenen Rassen könnten durch Fermente lysiert werden, welche die jungen Bazillen während ihrer Keimung aus Sporen produzieren. Die Fermente wirken am stärksten da, wo die besten Diffusionsbedingungen gegeben sind, also in der Nähe des Kondenswassers.

Auf Grund seiner Beobachtungen kommt Darányi also zu dem Ergebnis, daß es sich bei der beschriebenen Erscheinung nicht um eine Bakteriophagenwirkung, sondern um eine fermentative Lysierung der Milzbrandbazillen durch „spezifische isolytische Fermente“ handelt. Zur Unterstützung seiner Ansicht führt Darányi folgende Versuche an: Er bringt in kleine enge Glasröhrchen je $\frac{1}{2}$ ccm einer dicken Bouillonsuspension von asporogenen Milzbrandbazillen, fügt je $\frac{1}{2}$ ccm verflüssigten, auf 50° C abgekühlten Agar hinzu, mischt gut durch und läßt sofort unter Wasserstrahl erstarren, wodurch der Agar ein milchtrübes Aussehen erhält. Darauf setzt er noch $\frac{1}{2}$ ccm Bouillon mit einer Platinöse Milzbrandsporen hinzu und setzt die Proben für 24 Std. einer Temperatur von 37° C aus.

Im Falle, daß die aus den Sporen entkeimten Bazillen in der Bouillon spezifische Fermente produzieren, entsteht in der oberen Agarschicht eine ringförmige Aufhellung bzw. eine helle Zone.

Durch diese Versuche glaubt Darányi bewiesen zu haben, daß manche junge Milzbrandbazillensassen bei ihrer Entkeimung aus den Sporen aktiv

lytische Fermente bilden, die nicht identisch sind mit den autolytischen Fermenten, und die er daher als „spezifische isolytische Fermente“ bezeichnet. Letztere sind nach ihm das aktive Prinzip, auf welchem die sogenannte Pseudobakteriophagie bei Milzbrandbazillen zurückzuführen ist.

Diese Versuche Darányis sind meiner Meinung nach nicht stichhaltig; denn bei der „Pseudobakteriophagie“ werden von dem betreffenden Milzbrandbazillenstamm neue Eigenschaften erworben, die weiterhin erblich festgehalten werden. Dabei ist es gleichgültig, ob diese neuen Eigenschaften auf äußere Einflüsse wie Wärme, Licht oder auf „autolytische“ oder schließlich auf die „spezifisch isolytischen“ Fermente zurückzuführen sind. Das wesentliche ist, daß die durchsichtigen, wie auch die opaken Kolonien ihre Rasseneigenschaften durch mehrere Generationen beibehalten. Wie sollten sich außerdem aus den Sporen der fermentativ beeinflussten Kolonien immer wieder lebenskräftige Milzbrandbazillen entwickeln? Uebrigens bestehen die durchsichtigen Kolonien, wie oben bereits erwähnt, in der Regel tatsächlich aus sporenlosen langen Bakterienketten (s. o.).

Der Widerspruch zwischen meiner Auffassung und derjenigen von Darányi, sowie das Fehlen von Kontrollen bei seinen Versuchen veranlaßte mich zur Nachprüfung der Methode Darányis. Dabei konnte ich feststellen, daß bei Kontrollversuchen manchmal die Bouillon in die Agarschicht hineindiffundiert und dadurch allein schon eine helle Zone entsteht, welche mit der Zeit zunimmt. Andererseits ist es mir bei einem Material von 4 Milzbrandstämmen überhaupt nicht gelungen, eine Lysis der Bazillen durch „spezifische isolytische Fermente“ nach Darányi zustande zu bringen.

Ebenso ist es mir auch nicht gelungen, aus dem in der Nähe des Kondenswassers befindlichen Rasen weder „durchsichtige“ noch solche Kolonien zu isolieren, aus welchen in der Folge die beiden Kolonientypen entstanden wären.

Das Wesentliche bei der „Pseudobakteriophagie“ ist, daß ihre Erscheinungen nicht auf die Generation beschränkt bleiben, auf welche die „isolytischen Fermente“ eingewirkt haben, sondern daß bei ihr eine Uebertragung der neuerworbenen Eigenschaften stattfindet. Dies kann nur auf folgende Weise erklärt werden: Entweder die „Pseudobakteriophagie“ der Milzbrandbazillen ist als eine Variationserscheinung aufzufassen, oder — wenn tatsächlich eine fermentative Zerstörung vorliegt —, so ist diese auf die Wirkung eines schwach virulenten Bakteriophagen im Sinne d'Herelles zurückzuführen, der als steter Begleiter vorkommt. Will man die Beobachtungen Darányis trotz der obigen Einwände nicht vollständig ablehnen, so bleibt als dritte Möglichkeit für die Erklärung der „Pseudobakteriophagie“ nur noch die nicht sehr wahrscheinliche Annahme übrig, daß unter der Wirkung der „isolytischen Fermente“ einmalig die Bedingungen zur Entstehung eines Bakteriophagen geschaffen werden, der sich dann weiterhin als stetiger Begleiter der folgenden Generationen erhält und als solcher also — ohne erneute Einwirkung „isolytischer Fermente“ — die beschriebenen Kolonieveränderungen immer wieder hervorruft. Damit wäre aber zugleich angenommen, daß keine „Pseudobakteriophagie“, sondern eine echte Bakteriophagie vorliegt.

Ich halte die „spezifischen isolytischen Fermente“ Darányis für identisch mit dem „Antivirus“ Besredkas.

Nach Lehmendorf und Brumlik verhindert das „Antivirus“ die Entwicklung und die Vermehrung der Ausgangskulturen und biologisch verwandter Kulturen. So zeigt z. B. *Bact. coli* unter dem Einfluß des „Antivirus“ folgende Veränderungen in seinen Eigenschaften: Es verstärkt seine fermentativen und reduktiven Leistungen und verliert seine Beweglichkeit. Die Reduktion ist absolut spezifisch. Durch das „Antivirus“ wird weiter die Agglutinations-

fähigkeit der Typhusbakterien verändert. Die intensive Wirkung des „Antivirus“ läßt sich im Pfeifferschen Versuch gut demonstrieren (für junge Kulturen).

Epstein bestreitet den fermentativen Charakter des „Antivirus“. Nach ihm üben die Filtrate bei optimaler therapeutischer Beeinflussung keine bakterizide Wirkung gegenüber der Ausgangskultur aus, im Gegenteil, die Filtrate, also das „Antivirus“, besitzen konservierende Eigenschaften.

Aus alledem kann man folgende Schlußfolgerung ziehen:

Die von Pesch, Katzu und Brown und Basaka sowie Darányi beobachtete Pseudobakteriophagie bei Milzbrandbazillen ist als eine Varietätserscheinung der Milzbrandbazillen aufzufassen und nicht als autolytischer fermentativer Prozeß oder als lytischer Vorgang, hervorgerufen durch „spezifische isolytische Fermente“.

Die „spezifischen isolytischen Fermente“ Darányis scheinen also identisch zu sein mit dem „Antivirus“ von Besredka.

Obigen Ausführungen möchte ich hier noch eigene Untersuchungen neueren Datums beifügen.

Es handelt sich in folgendem um vergleichende Untersuchungen mit Kulturen eines Milzbrandstammes Nr. 244, die 10 Jahre lang aufbewahrt worden waren. Die Kulturen waren paraffiniert und standen bei Zimmertemperatur im Dunkeln.

Der Milzbrandstamm Nr. 244 hatte den Charakter einer normalen Varietät und war pathogen für Kaninchen, Meerschweinchen und weiße Mäuse. Derselbe diente zur Herstellung von Milzbrandantiserum von Pferden und Eseln. Unter den Kulturen dieses Stammes befand sich eine Rasse, die als „Abszeß“ bezeichnet war. Sie war isoliert aus einem Abszeß eines hochimmunisierten Pferdes, das einige Tage vorher mit massenhaften Milzbrandbazillen injiziert worden war. Der Stamm wurde seinerzeit gleich nach der Isolierung ausschließlich in Immunserum kultiviert.

Die meisten Kulturen, die nach 10 Jahren zur Nachprüfung kamen, waren ausgetrocknet und hatten eine mehr oder weniger körnige oder bröckelige gelatineartige Beschaffenheit angenommen. Zwecks Auffrischung wurden die Kulturen mit Bouillon aufgefüllt und 72 Std. lang bei 37° C bebrütet.

Von den sämtlichen angelegten 22 Rassen des ursprünglichen Stammes hatten sich nach der 10jährigen Aufbewahrung nur 15 Rassen, d. h. 68 Proz. in lebensfähigem Zustande erhalten und nur 10 Rassen davon zeigten das typische Wachstum eines normalen Milzbrandbazillus. Die übrigen 5 Rassen zeigten bei ihrer weiteren Kultivierung folgende Eigenschaften:

1) Rasse II „Abszeß“. Sie war vor der Aufbewahrung 2mal in Immunserum abgeimpft und in solchem zur Aufbewahrung angelegt worden. Sie zeigte, auf Agar kultiviert, schwaches Wachstum: Flache, glatte, grauweiße Kolonien; Bouillon blieb klar, Milch gerann nach 48 Std.; auf Gelatine keine charakteristische Borstenbildung.

Mikroskopisch: einzelne in Gruppen zu zwei oder zu drei hintereinander liegende Stäbchen. Bei der nächsten Ueberimpfung auf Agar kam es zu typischer Kettenbildung. Die Bazillen haben ihre Virulenz nicht eingebüßt. Milzausstriche enthielten schön entwickelte Kapseln.

2) Rasse XIII — Stichkultur in Agar. Sie war von der ursprünglichen Stammkultur Nr. 244 auf Agar abgeimpft und aufbewahrt worden. Sie zeigte eine gute Entwicklung auf den gewöhnlichen Nährböden. Die oberflächlichen Kolonien waren flach und matt; in Petruschky rosarot.

Mikroskopisch: Einzelne Bazillen und 2—3gliederige Ketten. Das übrige wie bei 1). Die Virulenz hat bedeutend abgenommen: Mäuse starben erst nach

7 Tagen. Im Blut- und Milzausstrich normale schöne Kapseln und kurze Ketten.

3) Rasse XIV „Abszeß“. Vor der Aufbewahrung 3mal in Immunsorum gezüchtet und in solchem angelegt. Wachstum in Bouillon, auf Agar usw. ohne Besonderheiten.

Mikroskopisch: 4—5gliederige Ketten. Geimpfte Mäuse sterben nach 48 Std. Im Milzausstrich lange Ketten und gut entwickelte Kapseln.

4) Rasse XVI „Abszeß“. Vor der Aufbewahrung 15mal in Immunsorum übergeimpft und in solchem aufbewahrt. Auf Agar sind die Kolonien genau so entwickelt wie bei Rasse II, nur sind sie im Durchschnitt etwas kleiner. In Bouillon Sedimentbildung, als ob die Bakterien agglutiniert wären.

Mikroskopisch: im Milzausstrich bilden sich Ketten, die 5mal länger sind als das Gesichtsfeld; gut entwickelte Kapseln. Virulenz unverändert. Mäuse sterben nach 48 Std.

5) Rasse XVII „Abszeß“. Genau wie bei 4).

Zusammenfassung.

1) Von normalen Rassen von Milzbrandbazillen, die in Milzbrandimmunsorum angelegt und 10 Jahre lang im Dunkeln bei Zimmertemperatur aufbewahrt waren, gehen etwa 50 Proz. zugrunde. — 2) Nur ein Teil der überlebenden Bazillen zeigt eine Veränderung auf Agar, Bouillon, Gelatine in bezug auf ihr Wachstum. Schon bei der ersten Ueberimpfung auf Agar sieht man vorwiegend vegetative Formen. — 3) Bei längerer Aufbewahrung auf Agar verlieren die Milzbrandbazillen bedeutend an Pathogenität. — 4) Die von einzelnen Autoren hervorgehobene Beobachtung, daß *Bacillus anthracis* bei Kultivierung in Milzbrandimmunsorum an Virulenz zunimmt, ist keine Regel. Umgekehrt bedeutet die Bildung von langen Bazillenketten im Tierkörper nicht immer, daß der Milzbrandbazillus seine Virulenz verringert hat. Gesteigerte Säureproduktion ist nicht immer ein Ausdruck für gesteigerte Virulenz. — 5) Die methodische Kultivierung von Milzbrandbazillen in Gelatine kann unter der Einwirkung von Wärme und Kälte zur Bildung von Variationen führen. — 6) Die „Pseudobakteriophagie“ bei Milzbrandbazillen ist als eine Varietätserscheinung der Milzbrandbazillen aufzufassen und nicht als autolytischer fermentativer Prozeß oder als lytischer Vorgang, hervorgerufen durch „spezifische isolytische Fermente“. — Die „spezifischen isolytischen Fermente“ Darányi scheinen identisch zu sein mit dem „Antivirus“ von Besredka.

Literatur.

1) Pesch, L. K., Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 93. 1924. H. 7/8. — 2) Katzu, Sh., Ebenda. Abt. I. Orig. Bd. 96. 1927. H. 5/6. — 3) Brown and Basaca, Proc. Soc. for exper. Biol. and Med. T. 23. 1926. p. 625. — 4) Markoff, Wl., Ztschr. f. Infektionskrankh. d. Haustiere. Bd. 12. 1912. H. 2. — 5) Ders., Medizinsko Spisanie [bulgar.] Jahrg. 8. Bd. 4. 1924. — 6) v. Darányi, J., Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 102. 1927. H. 6/7. — Lehmdorf und Brumlik, Wien. Gesellsch. f. Mikrobiol. 1927. 25. Januar.

Nachdruck verboten.

Agglutinationsreaktion bei Rhinosklerom. Bakteriophagenstudien II ¹⁾.

[Aus dem Hygienischen Institute der med. Fakultät in Zagreb (S. H. S.)
(Vorstand: Prof. Dr. Emil Prášek).]

Von Dr. E. Prášek und Dr. M. Prica.

Mit 1 Tafel.

Die Isolierung von Bakteriophagen gegen zahlreiche Bakterien gelingt verhältnismäßig leicht. Seltener findet man aber Bakteriophagen gegen schleimbildende, kapseltragende Arten.

Es ist uns nun gelungen, einen Bakteriophagen gegen *Bac. rhinoscleromatis* zu isolieren, ein Befund, der an und für sich nichts außergewöhnliches vorstellen würde. Im Laufe der Untersuchungen konnten wir aber wichtige Tatsachen feststellen, die eine Mitteilung berechtigt erscheinen lassen. Wir konnten nämlich willkürlich eine kapsellose Modifikation des *Bac. rhin.* aus allen bisher untersuchten Stämmen ²⁾ züchten, die sich außerdem zur spezif. Agglutinationsprobe als geeignet, wie auch als ein sehr gutes Agglutinogen herausstellte.

Der Bakteriophage.

Aus dem exzidierten Gewebe des Patienten A. Pisk Prot. Num. 236/26 der hiesigen Universitätsklinik für Ohren- und Nasenkrankheiten isolierten wir im Frühjahr 1927 einen Stamm von *Bac. rhinoscleromatis*, der ein völlig typisches kulturelles Verhalten zeigte, und der sich bei den von uns vorgenommenen zahlreichen Komplementbindungsversuchen als sehr geeignet (mit spezifischen Bindungsvermögen) bewährte. Er wurde auf gewöhnlichem Agar ³⁾ (pH 7,8) etwa wöchentlich überimpft bis zum August 1927, von welchem Zeitpunkte an er bis Mitte September im Kühlraume unter konstanter Temperatur von + 3° C gehalten wurde.

Bei einem Versuche, ihn weiter zu übertragen, versagte er und das Wachstum blieb auf allen gewöhnlichen Nährböden vollständig aus. Wir dachten dabei an eine eventuelle Anwesenheit von Bakteriophagen, was sich bestätigte. Nach Abschwemmen der alten Kultur und Filtrieren durch Berkefeld-N-Filter erhielten wir ein nach jeder Passage sich im lytischen Vermögen steigerndes Filtrat, das endlich in Bouillon bei Verdünnungen auf 10⁻⁷ noch ganz lösend wirkte. Er hält sich nach zahlreichen Passagen mit verschiedenen Rhinoskleromstämmen konstant auf dieser Stärke. Das Verhalten des Filtrats gegenüber höheren Temperaturen war folgendes:

Die Wirkung bleibt erhalten bei einer Einwirkung von 60° und 70° C, wogegen nach 1 Std. bei 80° C die Wirkung verloren geht. ½stünd. Einwirkung

1) Prášek, Prica, Medic. Pregled. 1928.

2) Eine Ausnahme fanden wir bei einem atypisch wachsenden Stamm von *B. rhinoscleromatis* (Ch.), der die Abspaltung neuer Formen nur sehr schwer und selten zeigte. Dieser Stamm stellte sich als lysogen heraus. Es gelang uns, aus ihm mittels Karbamid einen im Verhalten dem beschriebenen identischen Bakteriophagen zu isolieren. Ueber die Abspaltungstechnik wird eine besondere Mitteilung erscheinen.

3) Wir verwendeten bei dieser Arbeit, um konstante Verhältnisse zu schaffen, Merck'sche Nährbouillon Standard I resp. aus dieser hergestellten 3proz. Agar. pH stets 7,8.

von 80° C vernichtet dagegen die lytische Kraft nicht. (Bouillonfiltrat, Stärke 10⁻⁷, p_n 7,8).

Er wurde zunächst auf seine Spezifizität gegenüber einigen Stämmen von Kapselbakterien geprüft, und zwar: *Bac. rhinoscleromatis* (frische und alte Stämme unserer Sammlung, Stämme aus der Králschen Sammlung und Stämme die ich Herrn Prof. Honl, Prag, verdanke), und ferner gegen solche von *Bac. Friedländer*, *Bac. ozaenae* Abel, *Bac. Pfeiffer caps.*, *Bac. lactis aërogenes*. Außer einer sehr kräftigen Wirkung bei *Bac. rhin.* ließ sich nicht eine Spur von Einwirkung bei den anderen Bazillen konstatieren. Von anderen Bakterien wurden geprüft *B. coli*, dysent., Ty, Paraty B. Gärtner, Staphylokokken, Streptokokken. Auch hier zeigte sich keine Wirkung. In seiner jetzigen Form läßt sich daher dieser Bakteriophage geradezu als ein Identifikationsmittel für frisch isolierte Stämme des *Bac. rhin.* verwenden.

Die Prüfung erfolgte: Bei variierten Mengen des Bakteriophagen in Bouillonkultur und auf Agar (p_n 7,8). Was die Wirkung auf den *Bac. rhinoscleromatis* anlangt, so zeigte sie sich bei der Mischung von 1 Tropfen Filtrat und 1 Oese frischer Kultur d. *B. rhin.* nach 24 Std. bei 37° C auf Agarplatte als eine sehr starke Verminderung der Kolonien gegenüber den Kontrollplatten, als zahlreiche Flatterformen und im Auftreten einer neuen Art von Kolonien, die wir unten näher beschreiben werden.

Bei Züchtung in Bouillon trat gewöhnlich nach 72 Std. (12 Std. bei 37° C, dann Zimmertemperatur von 18—22° C) ein sekundäres Wachstum auf. Als wir die gewachsenen Sekundärkolonien auf der Agarplatte prüften, zeigte sich ein überraschendes Bild: Die Kolonien sind vor allem viel kleiner (s. Tafel) und erreichten gewöhnlich nur $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{3}$ des Durchmessers der typischen. Auch das Aussehen ist ganz abweichend: Keine Spur von glasigem, schleimigem Wachstum und keine radiäre Struktur. Diese sekundären Kolonien sind rund, kugelig erhaben, mit ganz scharfem Rand, kaum merklicher Granulation, durchscheinend und im auffallenden Licht grau. Diese Form erhielt sich bis jetzt 4 Monate lang auch bei täglicher Ueberimpfung auf Bouillon und Agar absolut konstant.

Mikroskopisch zeigte sich eine gewaltige Differenz (s. Tafel). Nach Fixierung des Ausstriches mit Osmiumdämpfen und Färben mit polychrom. Methylenblau (Unna), resultieren die gewöhnlichen Bilder einer voll ausgebildeten Kapsel. Die neuen, unter der Bakteriophagenwirkung entstandenen Kolonien zeigen ganz glatte Stäbchen, bei denen keine Spur von Kapsel vorhanden ist. Sonst läßt sich an den Stäbchen keine Aenderung im färberischen Verhalten nachweisen; ebenso erweisen sie sich als unbeweglich, wie die Ausgangsstämme. Die Prüfung auf Zuckerarten zeigte gleiches Verhalten, wie bei den ursprünglichen Stämmen. (Geprüft wurden: Glukose, Laktose, Saccharose, Mannit, Lackmusmolke). Indolbildung war negativ. (6 Tage, Ehrlich).

Tierversuch.

Auch hier ließ sich keine Veränderung gegenüber den Ausgangsstämmen nachweisen (wenigstens nicht in den bis jetzt ausgeführten Versuchen, die wir näher auszuarbeiten gedenken).

Je 2 Mäusen wird je $\frac{1}{10}$ einer Schrägagarkultur in 1 cem 0,9proz. NaCl aufgeschwemmt intraperitoneal injiziert, und zwar: a) von 2 unveränderten und b) von 2 aus ihnen durch den Bakteriophagen kapsellos gemachten Stämmen. Der Tod tritt bei allen fast gleichzeitig ein (20—24 Std.).

Sektion: Klares Exsudat im Peritoneum (stärker fadenziehend bei Mäusen mit Kapselbakterien), Milz vergrößert. —

Im Ausstrich nach oben erwähnter Methode gefärbt: a) Bei Mäusen mit unver-

ändertem *Bac. rhin.* zahlreiche typische Kapselbakterien. b) Bei Mäusen mit kapsellosen *B. geimpt*, zahlreiche kapsellose, aber auch kapseltragende Individuen.

Kulturen aus dem Peritoneum, Herzblut, Milz: a) Ausschließlich typische Kolonien, dem *Bac. rhin.* entsprechend. — b) Neben zahlreichen modifizierten kapsellosen Kolonien auch zahlreiche typische, schleimbildende.

Es ist also durch die Tierpassage teilweise wieder die ursprüngliche normale Form entstanden. Auf Grund dieser Tatsache (Rückkehr in die ursprüngliche Form nach Veränderung des Milieus) müssen wir die unter der Wirkung des Bakteriophagen entstandene Form als eine Modifikation des *Bac. rhin.* ansprechen.

Kapselverlust, und zwar spontaner, ist bei Kapselbakterien in der Literatur erwähnt bei *Bac. Friedländer* von Toenniessen, ferner bei Eisenberg, nach fortdauernder Kultivation auf eventuell besonderen Nährböden bei Beham, wie auch in einer während der Niederschrift dieser Arbeit erschienenen Notiz von Meisel et Mikulašek. Bei Gewinnung dieser Modifikationen war man jedoch vom Zufall abhängig, oder man brauchte geraume Zeit, um solche Veränderungen zu erreichen. Der Bakteriophage jedoch erlaubt uns in kürzester Zeit, aus einem beliebigem typischen Stamme diese Modifikation zu erreichen.

Vom Bakteriophagen ist in zahlreichen Fällen bekannt, daß er an manchen Bakterienarten mehr oder weniger kräftige Veränderungen morphologischen Charakters hervorrufen kann. Zu den bekanntesten gehören z. B. die Beobachtungen von ihnen hervorgerufenen schleimigen Wachstums (Bordet und Ciuca, d'Herelle, Twort und andere). In unserem Falle handelt es sich aber um sozusagen eine umgekehrte Erscheinung, wobei das Kapselbildungsvermögen prompt verloren geht und der Verlust konstant bleibt.

Wir prüften natürlich auch das serologische Verhalten dieser neuen Modifikation. Bei der Komplementbildung mit Serum von Rhinoskleromkranken lieferte uns auch diese Modifikation vollständig identische Resultate, sowohl was die leichte Reaktion, als auch strenge Spezifität anlangt, wie der unveränderte Stamm.

Es war nun naheliegend, mit dieser Modifikation auch die einfache Agglutinationsprobe zu versuchen, da bei Rhinoskleromkranken oft nach Agglutininen gefahndet worden ist. Eine brauchbare Methode ist jedoch nicht gefunden worden, so daß man an dem Vorkommen von Agglutininen bei Rhinoskleromkranken (wenigstens in größerer Stärke) gezweifelt hat.

Einen Fall von Agglutininachweis beim Rhinoskleromkranken in nennenswerter Stärke (1:1600) erwähnt nur Beham. Jedoch hat seine Methode, die langdauernde Umzüchtung auf besonderen Nährboden verlangt, keine weitere Verbreitung gefunden.

Mit einer Aufschwemmung der durch die Bakteriophagen bewirkten Modifikation gelingt es dagegen leicht, auch im Serum von Rhinoskleromkranken Agglutinine in größerer Stärke von streng spezifischem Charakter nachzuweisen.

Die Reaktion ist nach dem bisher untersuchten Material vollkommen spezifisch. Der Titer erreicht bei den Rhinoskleromkranken fast regelmäßig die Höhe von 1:3.200 + und öfters auch von 1:6.400 +, wogegen bei zahlreichen Kontrollen (anderweitige Erkrankungen, Gesunde) die Agglutininstärke max. 1:200 Spur erreicht.

Diese durch die neue Modifikation ermöglichte Agglutinationsprobe bereichert unsere Diagnostik mit einer einfachen spezifischen Methode, die, soweit wir bis jetzt behaupten dürfen, der Komplementbindung in nichts nachsteht, bezüglich der einfachen Methodik aber verlässlicher wegen Entfallens vieler Fehlerquellen sein dürfte. Wir möchten darauf hinweisen, daß uns bis jetzt

Tabelle I.

Das Serum wird mit 0,9 proz. NaCl zunächst auf 1:50 und weiter in üblicher Weise zu 0,5 ccm pro Röhrchen titriert. Zusatz von 3 Tropfen der Rhinosklerombazillen, kapsellos (Bakteriophage).

Die Emulsion wurde bereitet durch Aufschwemmen von 1 Agar (schräg), 12 Std. gewachsen, in 5 ccm NaCl 0,9proz.

Die Proben bleiben 2 Std. bei 37° C, dann über Nacht im Kühlraum + 3° C. Ablesung, nachdem die Proben 1 Std. bei Zimmertemperatur gestanden haben. Kontrollen: Bazillen in NaCl; bei Rhinoskleromseren immer einige normale wie auch ein Rhinoskleromkaninchen I.-S. mittitriert.

Lauf. Nr.	Name	Agglutinationstiter	Klinische Diagnose; bei Wassermann-Sera Ausfall der Reaktion
1.	P. J.	1:1600 + 1:3200. Spur.	Rhinosklerom ²⁾ .
2.	B. S.	1) 1:3200 + 1:6400 deutl. Spur	Rhinosklerom laryngis ²⁾ .
3.	M. I.	1) 1:3200 +	Rhinoscl. laryngis et pharyngis ²⁾ .
4.	S. F.	1:3200 +	Rhinoscleroma ²⁾ .
5.	Š. J.	1) 1:3200 +	Rhinoscleroma ²⁾ .
6.	T. A.	1:3200 +	Rhinoscleroma nasi et pharyngis ²⁾ .
7.	M. S.	1) 1:3200 + 1:6400. Spur	Rhinoscl. pharyngis et laryngis ²⁾ .
8.	Š. F.	1) 1:3200 + 1:6400 +	Rhinoscleroma laryngis ²⁾ .
8a	D. J.	1) 1:12 000 +	Rhinoscleroma laryngis incip.
9.	F. Z.	1:50 + 1:100. Spur.	Polyposis nasi.
10.	L. K.	1:50 + 1:100. „	Tbc. nasi.
11.	B. M.	1:50 + 1:100. „	Rhinitis chron. specif.?
12.	J. N.	1:50 + 1:100. „	Rhinitis sicca anterior chron.
13.	D. J.	1:50 + 1:100. „	Polysinitis paranasalis partim catarrhale partim purulenta.
14.	O. A.	1:50 + 1:100 „	Polyposis nasi.
15.	K. I.	1:50 + 1:100. „	Rhinoscleroma ²⁾ .
16.	K. Gj.	1:50 + 1:100. „	Rhinoscleroma ²⁾ .
17.	E. M.	1:50 + 1:100. „	Polyposis nasi.
18.	B. P.	1:50 + 1:100. „	Ozaena.
19.	S. R.	1:50 + 1:100. „	Ozaena.
20.	P. R.	1:50 + 1:100. „	Ozaena.
21.	H. T.	1:50 + 1:100. „	Polyposis nasi
22.	P. V.	1:50 + 1:100. „	Rhinitis sicca.
23.	N. K.	1:50 + 1:100. „	Typhus abdominalis.
24.	Wssr. 1.	1:50 + 1:100. „	W. ⁴⁾ + + + +
25.	Wssr. 2.	1:50. Spur.	W. + + + +
26.	Wssr. 3.	1:50. „	W. —
27.	Wssr. 4.	1:50. „	W. —
28.	Wssr. 5.	1:50 + 1:100. Spur.	W. —
29.	Wssr. 6.	1:50 + 1:100. „	W. —
30.	Wssr. 7.	1:50 + 1:100. „	W. —
31.	Wssr. 8.	1:50 + 1:100. „	W. —
32.	Wssr. 9.	1:50. Spur.	W. + + + +
33.	Wssr. 10.	1:50 + 1:100. Spur.	W. + + + +
34.	Wssr. 11.	1:50 + 1:100. „	W. + + + +
35.	Wssr. 12.	1:50 + 1:100. „	W. —
36.	Wssr. 13.	1:50 + 1:100. „	W. + + + +
37.	Wssr. 14.	1:50 + 1:100. „	W. —
38.	Wssr. 15.	1:100 + 1:200. „	M. ⁵⁾ + + + +
39.	Wssr. 16.	1:100 + 1:200. „	M. + + + +
40.	Wssr. 17.	1:50 + 1:100. „	W. —
41.	Wssr. 18.	1:50 + 1:100. „	W. + + + +

1) Bei dieser Hemmung (deutl. schwächere Agglutination) in Röhrchen 1:50, 1:100 (Zonenphänomen).

2) Bei sämtlichen Kranken histologisch Sklerom; Komplementbindung mit Bac. rhinoscl. stark positiv (+ + + +).

3) Klinische Anfrage; histologisch negativ; Komplementbindung negativ; weitere klin. Beobachtungen negativ. 4) Wassermannsche Reaktion. 5) Meinicke.

Tabelle I (Fortsetzung).

Lauf. Nr.	Name	Agglutinationstiter	Klinische Diagnose; bei Wassermann-Sera Ausfall der Reaktion
42.	Wssr. 19.	1:50. Spur.	W. ++
43.	Wssr. 20.	1:50 + 1:100. Spur.	W. —
44.	Wssr. 21.	1:100 + 1:200. „	M. +++++
45.	Wssr. 22.	1:100 + 1:200. „	M. +++++
46.	Wssr. 23.	1:50. Spur.	W. —
47.	Wssr. 24.	1:50 + 1:100. Spur.	W. +++++
48.	Wssr. 25.	1:50 + 1:100. „	W. —
49.	Wssr. 26.	1:50 + 1:100. „	W. —
50.	Wssr. 27.	1:50 + 1:100. „	W. —
51.	Wssr. 28.	1:50 + 1:100. „	W. —
52.	Wssr. 29.	1:50 + 1:100. „	M. +++++
53.	Wssr. 30.	1:50. Spur.	W. —
54.	Wssr. 31.	1:50. „	W. —
55.	Wssr. 32.	1:50 + 1:100. Spur.	W. —
56.	Wssr. 33.	1:50 + 1:100. „	W. —
57.	Wssr. 34.	1:50. Spur.	W. —
58.	Wssr. 35.	1:50. „	W. +++++
59.	Wssr. 36.	1:50 + 1:100. Spur.	W. —
60.	Wssr. 37.	1:50 + 1:100. „	W. +++++
61.	Wssr. 38.	1:50 + 1:100. „	W. +++++
62.	Wssr. 39.	1:50 + 1:100. „	W. +++++
63.	Wssr. 40.	1:50 + 1:100. „	M. — —
64.	Wssr. 41.	1:50 + 1:100. „	W. —
65.	Wssr. 42.	1:50 + 1:100. „	W. —
66.	Wssr. 43.	1:50 + 1:100. „	W. —
67.	Wssr. 44.	1:50 + 1:100. „	W. —
68.	Wssr. 45.	1:50 + 1:100. „	W. —
69.	Wssr. 46.	1:50 + 1:100. „	W. —
70.	Wssr. 47.	1:50 + 1:100. „	W. —
71.	Wssr. 48.	1:50 + 1:100. „	W. —
72.	Wssr. 49.	1:50 + 1:100. „	W. —
73.	Wssr. 50.	1:50. Spur.	W. —
74.	Wssr. 51.	1:50 + 1:100. Spur.	W. —
75.	Wssr. 52.	1:50 + 1:100. „	W. —
76.	Wssr. 53.	1:50 + 1:100. „	W. —
77.	Wssr. 54.	1:50. Spur.	W. —
78.	Wssr. 55.	1:50 + 1:100. Spur.	W. +++++, M. ++
79.	Wssr. 56.	1:50 + 1:100. „	W. —
80.	Wssr. 57.	1:50 + 1:100. „	W. —
81.	Wssr. 58.	1:50 + 1:100. „	W. —
82.	Wssr. 59.	1:50 + 1:100. „	W. +++++
83.	Wssr. 60.	1:100 + 1:200. „	M. +++++
84.	Wssr. 61.	1:50 + 1:100. „	W. +++++
85.	Wssr. 62.	1:50. Spur.	W. —
86.	Wssr. 63.	1:50. „	W. —
87.	Wssr. 64.	1:50 + 1:100. Spur.	W. —, M. ++
88.	Wssr. 65.	1:50 + 1:100. „	W. +++++
89.	Wssr. 66.	1:50 + 1:100. „	W. +++++

kein Fall von Ozaena, oder von anderen chronischen Nasenerkrankungen eine positive Reaktion gegeben hat (s. Tabelle). Wir versprechen uns ferner auch noch interessante Resultate bei Anwendung unserer Methode in der epidemiologischen Forschung¹⁾.

In einer weiteren Arbeit werden wir über die Immunisierungsvorgänge beim Rhinosklerom und anderen Kapselbakterien berichten. Vorläufig möchten wir aber folgendes hervorheben: Die Gewinnung von Agglutininen bei den

1) Prášek, Prica, Acta rhinolaryngol. 1928.

Kapselbakterien, speziell bei *Bac. rhin.* ist bis jetzt auf bedeutende Schwierigkeiten gestoßen. Versuche zu ihrer Gewinnung (*Bac. Friedländer*) unternahm als erster Landsteiner, der aber nur sehr schwach wirkende Sera nach langer Immunisierung und mit großen Mengen von Bakterien erhalten konnte. Clairmont und Porges erhielten auch bei *Bac. rhin.* relativ sehr schwache Sera und sehr unregelmäßig. Andere Autoren, z. B. Streit, Erben, Ballner und Reibmayer, berichten über nicht genügend spezifische Antikörper. Als Grund dieses abnormen Verhaltens wird die stark ausgebildete Kapsel angenommen. Porges gelang es in der Tat, durch Entfernung der Kapsel auf chemischen Wege die Resultate bedeutend zu verbessern. Nach unseren Erfahrungen ist diese Methode jedoch nicht ideal, da sie scheinbar nicht alle Hindernisse beseitigt und ferner ist sie doch ziemlich eingreifend und befähigt, das Antigen wesentlich zu verändern. Wir erhielten mit ihr nicht immer gute Resultate. Die so gewonnenen Emulsionen neigen zur Autoagglutination (Säurewirkung).

Auch die Verwendung von spontan kapsellos gewordenen Stämmen erfüllt nicht alle Anforderungen, da die antigene Fähigkeit nach unseren Erfahrungen recht beträchtlich wechselt; namentlich eignen sich solche Stämme doch nicht immer und in tadelloser Weise zur Verwendung als agglutinable Substanz.

Wir haben bereits früher eine Methode¹⁾ gefunden, mit welcher die Gewinnung von Immunkörpern (Agglutininen, Präzip. Bordet-Gengou-Körpern) leicht gelingt. Sie beruht auf der Verwendung von Bakterien, die in geeigneter Weise mit Karbamid gelöst wurden. Wir erreichten so wiederholt und leicht beim Kaninchen Agglutinine in der Stärke von 1:3.200, schwächer bei Präzipitinen.

Noch viel leichter gelingt die Immunisierung mit unserer neuen Modifikation (modif. nuda). Schon nach 3—4maliger Injektion einer Aufschwemmung von (durch Hitze 60° C) abgetöteten kapsellosen *Bac. rhin.* aus $\frac{1}{8}$ Agarplatte erhielten wir öfters Sera, die einen Agglutinintiter bis 1:12000 zeigten. Neben dem Porgesschen Antigen setzte uns die Bereitung des Antigens²⁾ durch unsere Karbamidmethode instand, Untersuchungen über die Spezifizität der erhaltenen Agglutinine, resp. Präzipitine anzustellen. Die Versuche sind zwar noch nicht abgeschlossen, doch kann man bis jetzt sagen, daß die Seren sehr spezifisch reagieren.

Wir untersuchten bis jetzt einige nach Porges präparierte, als auch mit Karbamid gelöste Stämme von *Bac. Friedländer*, *Bac. ozaenae*, *Bac. caps. Pfeiffer* und *Bac. lactis aërogenes*.

Es scheint, daß man mittels dieser Methode die bei anderen Bakterien übliche agglutinatorische Identifikation bei *Bac. rhin.* wird durchführen können. Auch wird sich vielleicht die Frage lösen lassen, ob bei *Bac. rhin.* ähnliche Gruppen bestehen, wie sie z. B. bei *Bac. Friedländer* beschrieben worden sind.

Hervorheben möchten wir noch, eine auffallende Differenz im antigenen Verhalten des *Bac. rhin.* im Tierkörper und im menschlichen Organismus. Wie man aus obiger Mitteilung ersieht, bildet der Mensch Agglutinine anschei-

1) Noch nicht publiziert.

2) Als Antigen verwendeten wir Bakterien, die mit Karbamid gelöst, durch Dialyse von diesem befreit waren. Man erhält so eine fast klare Flüssigkeit, die beim Zusammenbringen mit Serum nach der Technik der Präzipitationsreaktion starke Flockungen zeigt. Wir werden darüber in einer Arbeit ausführlicher berichten. Die Verwendung von Karbamid scheint uns sehr zweckmäßig, da es sich bei der Auflösung der Proteine kaum um tiefgreifendere chemische Prozesse handelt, sondern wohl um Veränderungen des Dispersitätsgrades derselben. So präpariertes Antigen eignet sich überhaupt sehr gut zur Gewinnung von Antikörpern.

nend leicht, und wahrscheinlich regelmäßig, ebenso Bordet-Gengou Körper und Präzipitine. Die Einverleibung auch von sehr großen Mengen unveränderter Rhinosklerombazillen in den Kaninchenkörper entstehen jedoch auch bei sehr langer Immunisierung nur minimale Mengen von Antikörpern. Wir glaubten daher, daß dieser Umstand vielleicht von Wichtigkeit sein kann für die Erklärung der bis jetzt mißlungenen spezifischen pathogenen Applikation dieser Erreger an Tiere und sind mit der Bearbeitung dieser Frage beschäftigt. Es war auch von Interesse, das künstlich gewonnene (Kaninchenagglutinin) wie auch das beim Menschen konstatierte auf die Absorptionsfähigkeit sowohl durch kapseltragende, als auch kapsellose *Bac. rhin.* zu prüfen.

Tabelle II.

5 ccm Immunserum, verdünnt 1 : 100 wird 2mal mit je 3 Oesen frischer Rhinoskleromkultur erschöpft. Die Emulsion wird jedesmal mit dem Serum 2 Std. bei 37° C, dann 24 Std. im Kühlraum belassen, darauf zentrifugiert. (Die Prozedur wird nochmals wiederholt.)

Das vollkommen klare Zentrifugat wird in fallenden Verdünnungsreihen mit Emulsionen, 1 Schrägagar auf 5 ccm 1proz. NaCl, von *B. rhinoscleromatis orig.* und *B. rhin. mod. nuda* titriert.

Je 0,5 ccm Serumverdünnung, 3 Kapillartropfen Bazillenemulsion.

Kan.-I.-Ser.	Titer des Serums	Titer nach Absorption mit Rh. Orig.
Nr. 70	1 : 6400	1 : 600

Titer nach Absorption mit Rh. kapsellos
1 : 100

Derselbe Versuch mit Patientenserum Bil. ausgeführt.

Rhinoskleromkranker B. S.		
Titer des Serums	n. Abs. m. Rh. Orig.	n. Abs. m. Rh. kapsellos
1 : 3200	1 : 200	1 : 50

Es zeigt sich dabei, daß den kapseltragenden *Bac. rhin.* nur eine schwache Absorptionsfähigkeit innewohnt, wogegen die *Modificatio nuda* beiläufig dasselbe Absorptionsvermögen zeigt, wie wir dies bei anderen agglutinablen Bakterien zu sehen gewohnt sind. Auch diese Verhältnisse haben wir einem näheren Studium unterworfen und wollen darüber später berichten, wobei wir auch die Rolle der Stoffe aus denen die Kapsel besteht, in Betracht ziehen wollen; ferner ob ähnliche oder andere Verhältnisse bestehen, wie sie für den *Bac. Friedländer L. A. Julianelle* beschreibt.

Zusammenfassung.

Es wurde ein Bakteriophage gegen *Bac. rhinoscleromatis* isoliert. Er bewirkte das Auftreten einer neuen, kapsellosen Modifikation des *Bac. rhinoscleromatis*. — Diese Modifikation (*Bac. rhinoscleromatis mod. nuda*) läßt sich als agglutinable Substanz zur Ausführung einer spezifischen Agglutinationsprobe im Serum von Rhinoskleromkranken verwenden. Es lassen sich auf diese Weise bei Rhinoskleromkranken Agglutinine bis zu einer Stärke von 1 : 6400 nachweisen. — Die neue Modifikation ist ein sehr gutes Antigen.

Literatur.

Hadley, Ph., *Proceed of the Soc. f. exp. Biol. a. Med.* Bd. 23. Nr. 2. p. 109 (uns nur im Referat zugänglich; zit. nach *Ber. f. d. ges. Physiol.* Bd. 37. S. 213). — Toenniessen, E., *Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig.* Bd. 13. S. 241. — Eisenberg, Ph., *ebenda.* Bd. 13. S. 449. — Ausführliche Literatur über Veränderungen der Bakterien durch Bakteriophagenwirkung siehe bei Otto und Munter in *Weichardts Ergebn.* Bd. 6. 1924; C. J. Schuurmann, *Der*

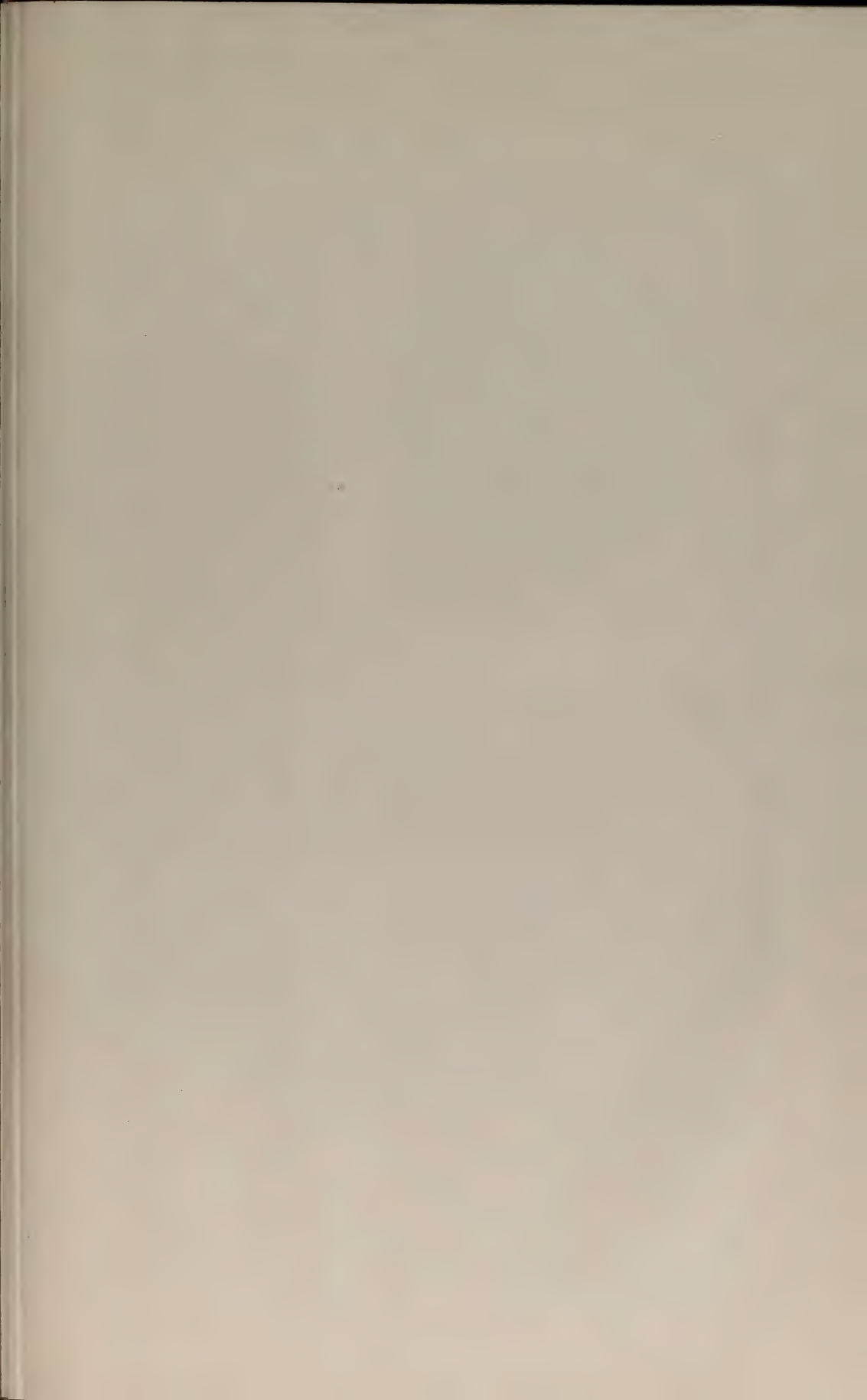




Fig. 1

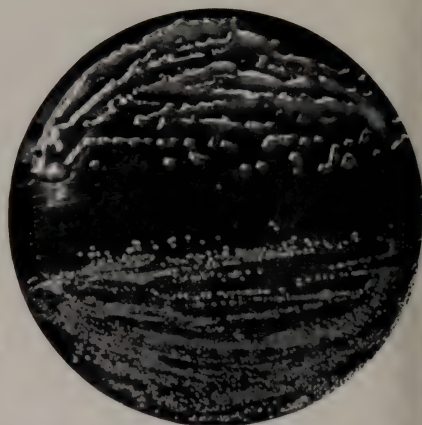


Fig. 2

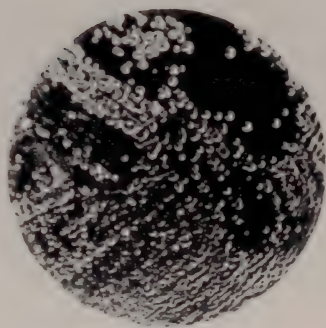


Fig. 5

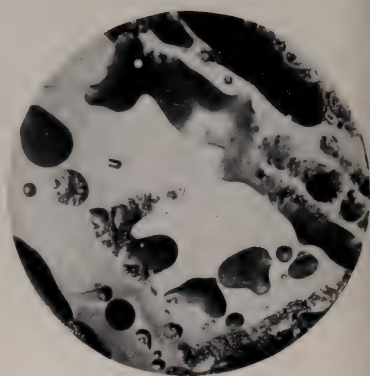


Fig. 6

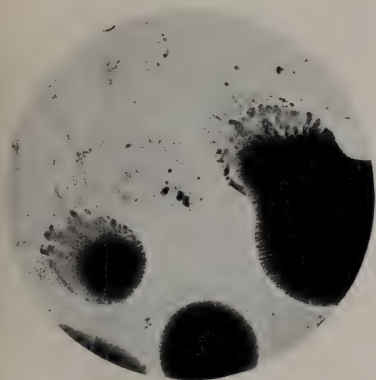


Fig. 3

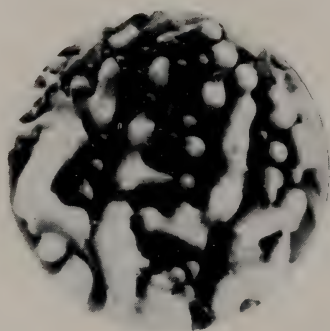


Fig. 4

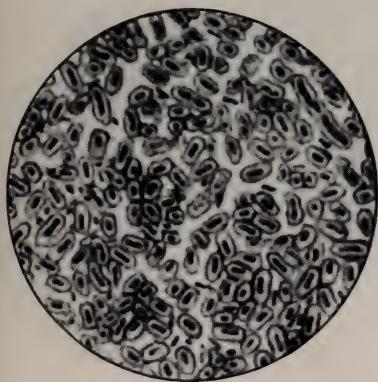
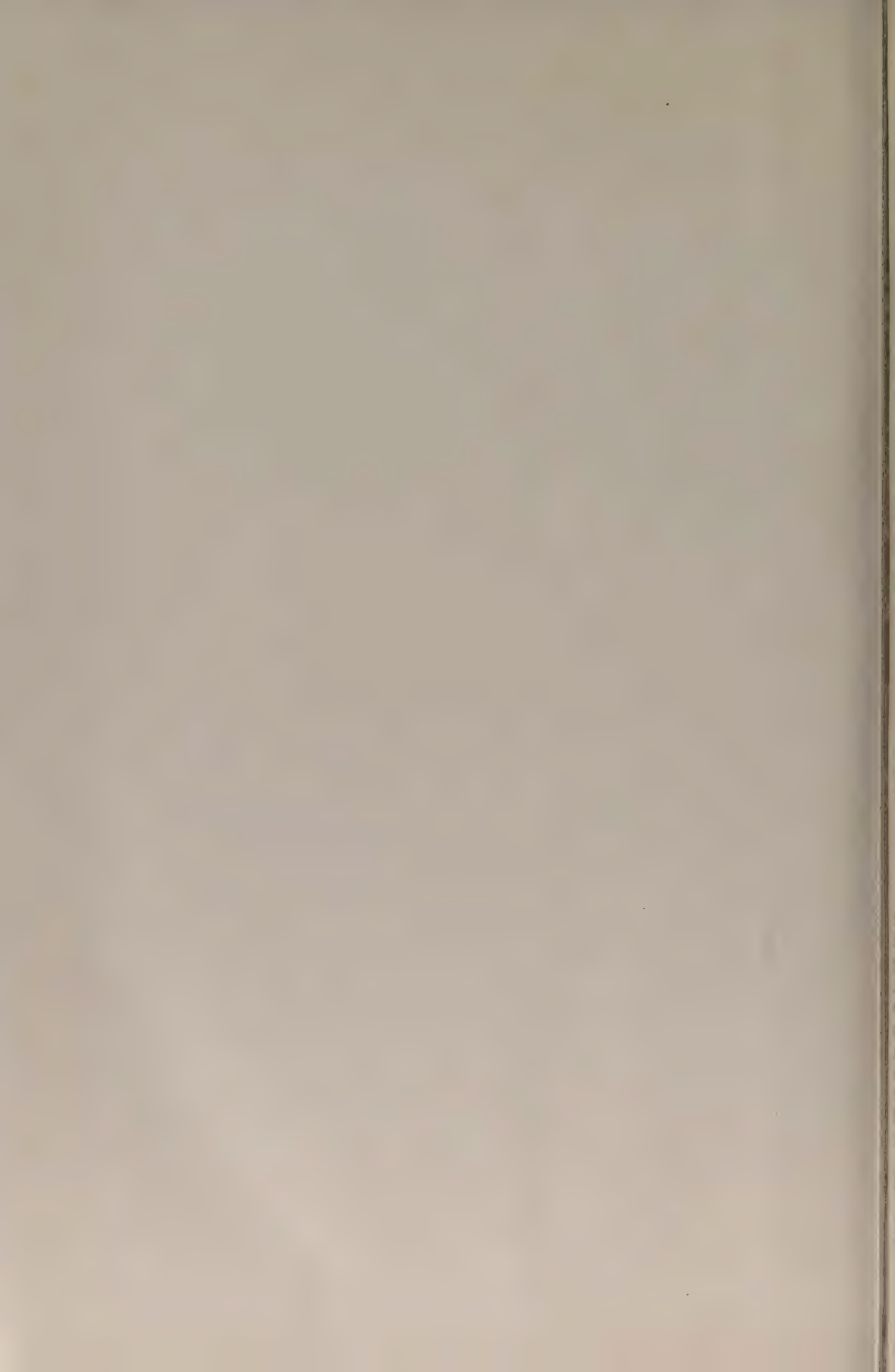


Fig. 7



Fig. 8



Bakteriophage eine Ultramikrobe (Uebers.). Berlin 1927; Otto und Munter, Handb. d. pathog. Mikroorg. 3. Aufl. 1927. H. 12. — Landsteiner, K., Wien. klin. Wochenschr. 1897. Nr. 10. S. 443. — Clairmont, P., Ztschr. f. Hyg. Bd. 39. 1902. S. 1. — Kraus, R., zit. nach Clairmont, l. c. — Porges, O., Wien. klin. Wochenschr. 1905. Nr. 18. S. 691. — Streit, H., Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 40. 1906. S. 709. — Beham, L. M., ebenda. Abt. I. Orig. Bd. 66. S. 660. — Meisel et Mikulašek, Compt. Rend. Soc. Biol. T. 97. 1927. p. 1495. — Literatur über Immunisierung und Agglutination bei Kapselbakterien überhaupt: ältere: Clairmont, l. c. — Paltauf, Kolle-Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorg. 2. Aufl. Bd. 2. S. 483. — Auch neuere: Julianelle, L. A., Journ. exp. Med. Vol. 44. 1926. S. 113, 683.

Erklärung der Tafelabbildungen.

Fig. 1. Bakteriophagenwirkung (Agarplatte) nach 12 Std. Die Platte wurde zunächst mit *B. rhinoscleromatis* beimpft und dann auf 5 Stellen je 1 kapillarer Tropfen von Bakteriophagen-Lysin (Bouillon) aufgetragen.

Fig. 2. Linke Plattenhälfte mit typischem *B. rhinoscleromatis* beimpft, rechte mit demselben Stamm, der jedoch durch den Bakteriophagen in die Modif. nuda übergeführt wurde.

Fig. 3. Kolonien vom Rande der ausgespaarten Stellen der Fig. 1, durch Bakteriophagenwirkung verändert. Vergrößerung ca. 6fach.

Fig. 4. Normale Kolonien des *B. rhinoscleromatis*, ca. 3mal vergrößert.

Fig. 5. Kolonien des *B. rhinoscleromatis*. Modif. nuda. (Dieselbe Vergrößerung, dieselben Aufnahmebedingungen.)

Fig. 6. Bakteriophagenwirkung auf *B. rhinoscleromatis* (Bakteriophage rhinoscleromatis.) III Vergrößert ca. 3,5mal.

Fig. 7. Ausstrich von typischem *B. rhinoscleromatis*, gefärbt nach Osmiumfixation mit ploychrom. Methylenblau.

Fig. 8. Ausstrich der Modif. nuda, ebenso gefärbt. Fig. 6 und 7 1300mal vergrößert. Zeiss-Apochromat 2 mm, Ap. 1,40. Homal. IV.

Nachdruck verboten.

Agglutinatorische Einteilung von *Bacillus faecalis alkaligenes*.

[Aus dem bakteriologischen Institut der Universität Sendai (Direktor: Prof. Dr. K. Aoki)].

Von Dr. G. Takayanagi.

Wie schon häufig von uns mitgeteilt wurde, sind viele Bakterienarten aus mehreren agglutinatorischen Typen zusammengesetzt. So wurden *Proteus*-bazillen von Aoki, Iizukau, Matsui in 16 agglutinatorische Gruppen eingeteilt, *Prodigiosus* von Aoki und Honda in 5, *Paratyphusbazillen* von Aoki und seinen Schülern in 7, *Dysenteriebazillen* von Aoki in 11, *Pyocyaneusbazillen* von Aoki in 22 und *Meningokokken* von Kondo in 13. Neuerdings ist es mir nun auch gelungen, die *Perezschen Kockbazillen* in 8 Gruppen zu differenzieren. Auf Grund dieser Beobachtungen schien es mir ebenso interessant wie wichtig zu sein, auch beim *Bacillus faecalis alkaligenes* agglutinatorische Typen zu bestimmen, weil darüber noch wenig in der Literatur zu finden ist. Nur von Klimenko wurden sie in 6 agglutinatorische Typen differenziert.

Bei unseren Untersuchungen wurden diejenigen Bakterien als *Bacillus faecalis alkaligenes* angenommen, welche folgende Eigenschaften zeigten: Morphologisches: Kurze Stäbchen, welche so groß waren, wie *Typhusbazillen*.

Geißelbildung war bei diesen Mikroben ganz mangelhaft, so daß sie wenig

peritrichisch begeißelt waren. Dabei wurde sehr häufig bemerkt, daß manchmal nur 2 Geißeln an beiden Enden nachweisbar waren. Sie waren gramnegativ.

Kulturelles: Auf Agarnährboden bildeten sie einen fast so dünnen Belag, wie Typhusbazillen. Traubenzucker wurde von ihnen gar nicht vergoren und Milch nicht verändert. Durch dieses Verhalten täuschen sie manchmal Typhusbazillen vor. Doch zeigten sie auf anderen Nährböden Erscheinungen, durch die man sie von den Typhusbazillen leicht unterscheiden kann: Sie wuchsen nämlich in Lackmusmolke alkalibildend. Auf Kartoffel bildeten sie einen dünnen, feuchten, bräunlichen Belag, welcher bei Typhus nicht vorkommt. Zuckerarten wurden von ihnen gar nicht vergoren. Auf Dieudonnéschem Nährboden wuchsen sie gut, ebenso wie Choleravibrionen.

58 Stämme von Bakterien, welche die obigen Eigenschaften gezeigt hatten, wurden von uns zu verschiedenem Untersuchungsmaterial gezüchtet:

- | | |
|-------------------------------------|----|
| 1) aus Kot von typhöser Erkrankung | 49 |
| 2) aus Harn bei typhöser Erkrankung | 6 |
| 3) aus Eiter von Appendicitis | 3. |

Sie wurden zuerst in verschiedenen repräsentierenden Seren agglutinatorisch untersucht, um zu sehen, ob sie in anderen bekannten Immunsereen reagierbar sind. Die Seren waren folgende: Typhus, Paratyphus B, Mäusetyphus, Paratyphus A, Hogcholera, Newport, Stanley, L, Hühnertyphus, *Bacillus pullorum*, Gärtner und *Abortus equi*. In diesen wurden sie gar nicht beeinflußt.

Sie wurden in 3 Teile geteilt und untersucht, und zwar im 1. Teile im ganzen 22 Stämme. Von diesen wurden 5 ausgewählt. Mit gesteigerten Dosen der einzelnen Stämme wurden 5 Kaninchen in 7tägigen Intervallen 5mal subkutan vorbehandelt. Die Tiere lieferten immer gut wirkende Seren. Auf diese Weise wurden 5 Seren hergestellt. Zuerst wurden die 5 Stämme, mit denen die 5 Seren hergestellt waren, in den ihnen entsprechenden Seren kreuzweise agglutiniert, um festzustellen, ob sie agglutinatorisch gegenseitig verschieden sind. Dabei ergab sich, daß sie in 2 agglutinatorische Gruppen differenziert werden konnten, die als Gruppe 1 und 2 bezeichnet wurden. Die 1. Gruppe enthielt 2 Stämme: Fa. 13 und Fa. 15, die 2. Gruppe 3 Stämme: Fa. 23, Fa. 28 und Fa. 89 (Tab. I).

Tabelle I.

Name der Bakterien	Name der Immunsere				
	Fa 13	Fa 15	Fa 23	Fa 28	Fa 89
	5 000	10 000	10 000	10 000	5 000
Fa 13	5 000	10 000	100—	100—	100—
Fa 15	5 000	10 000	100—	100—	100—
Fa 23	100—	100—	10 000	10 000	5 000
Fa 28	100—	100—	10 000	10 000	5 000
Fa 89	100—	100—	10 000	10 000	5 000

Dann wurden die übrigen 17 Stämme in den beiden Seren agglutinatorisch untersucht und dabei festgestellt, daß 13 Stämme darunter im Serum aus der 2. Gruppe bis zum Titer, in den anderen Seren aber gar nicht agglutinierten, so daß sie als zur 2. Gruppe gehörig angesehen werden müssen.

Die 4 übrigen Stämme wurden von keinem der Seren beeinflußt, weshalb sie als eine neue Sorte angesehen werden müssen. Wir behandelten deshalb 4 Kaninchen mit diesen 4 Stämmen vor, wie oben beschrieben, und stellten damit 4 gut wirkende Seren her, in denen die ihnen entsprechenden 4 Stämme

agglutinatorisch untersucht wurden. Dabei ergab sich, daß sie einzeln agglutinatorisch ganz verschieden sind.

Wir stellten daher damit 4 neue agglutinatorische Typen her, die wir als 3., 4., 5. und 6. bezeichneten (Tab. II). Diese 4 Seren beeinflussten die Stämme

Tabelle II.

Name der Bakterien	Name der Immunsere			
	Fa 14	Fa 22	Fa 24	Fa 26
	10 000	10 000	5 000	10 000
Fa 14	10 000	100—	100—	100—
Fa 22	100—	10 000	100—	100—
Fa 24	100—	100—	5 000	100—
Fa 16	100—	100—	100—	10 000

aus den anderen 2 Gruppen, der 1. und 2., nicht. Also wurden die 22 Stämme *Faecalis alkaligenes* in 6 agglutinatorische Typen differenziert; dabei wurde aber keine Mitagglutination beobachtet. Im 2. Teile wurden 29 Stämme von *Faecalis alkaligenes* gesammelt, welche in den 6 Seren, wie oben berichtet, 6 agglutinatorische Typen repräsentieren, agglutinatorisch untersucht.

Dabei ergab sich, daß 2 Stämme zur 1. Gruppe, 12 Stämme zur 2. Gruppe gehörten, während die übrigen 15 Stämme, wie oben festgestellt wurde, noch zu anderen Gruppen gehören. Von diesen 15 Stämmen wurden 6 ausgewählt, mit denen 6 Seren bei Kaninchen ganz wie vorher hergestellt wurden, in denen die ihnen entsprechenden 6 Stämme agglutinatorisch untersucht wurden. Hierbei zeigte es sich, daß sie in 4 Gruppen differenzierbar sind, die als 7., 8., 9. und 10. bezeichnet wurden (Tab. III), wogegen die übrigen 9 Stämme in

Tabelle III.

Name der Bakterien	Name der Immunsere					
	Fa 67	Fa 68	Fa 31	Fa 36	Fa 34	Fa 41
	5 000	10 000	10 000	10 000	10 000	5 000
Fa 67	5 000	10 000	100—	100—	100—	100—
Fa 68	5 000	10 000	100—	100—	100—	100—
Fa 31	100—	100—	10 000	10 000	100—	100—
Fa 36	100—	100—	10 000	10 000	100—	100—
Fa 34	100—	100—	100—	100—	10 000	100—
Fa 41	100—	100—	100—	100—	100—	5 000

diesen 4 Seren agglutinatorisch geprüft worden sind. Dabei wurde nachgewiesen, daß 1 Stamm zur 7. Gruppe und 4 Stämme zur 8. gehörten. Bei den 4 übrigen Stämmen wurde nicht bestimmt, zu welchen Typen sie gehören. Deshalb wurden 4 Seren mit diesen 4 Stämmen bei Kaninchen hergestellt und genau so untersucht, wie oben, wobei sich ergab, daß sie in 3 Gruppen differenzierbar sind, nämlich in die 11., 12. und 13. Gruppe (Tab. IV auf S. 386).

Durch obige Untersuchungen wurde also nachgewiesen, daß unter den 29 Stämmen von *Faecalis alkaligenes*, welche im 2. Teile gesammelt worden waren, 7 neue Typen vorhanden sind, welche von den anderen 6 Typen aus dem 1. Teile ganz verschieden sind.

In dem 3. Teile wurden 7 Stämme von *Faecalis alkaligenes* gesammelt und in den 13 Seren, welche die obigen 13 Gruppen darstellen, agglutinatorisch untersucht. Dabei wurde festgestellt, daß 1 Stamm zur 1. Gruppe, 2 Stämme

zur 2., 1 Stamm zur 7. und noch 1 Stamm zur 10. Gruppe gehörten, während die übrigen 2 Stämme in keinen Seren agglutinierten. Deshalb wurden 2 Seren mit diesen Stämmen hergestellt, in denen sie gegenseitig ganz verschieden agglutinierten, so daß sie als 2 neue differenzierte Gruppen betrachtet werden müssen, die als Gruppe 14 und 15 bezeichnet wurden (Tab. V). Wie aus allen

Tabelle IV.

Name der Bakterien	Name der Immunsere			
	Fa 44	Fa 49	Fa 60	Fa 61
	10 000	10 000	5000	10 000
Fa 44	10 000	100—	100—	100—
Fa 49	100—	10 000	5000	100—
Fa 60	100—	10 000	5000	100—
Fa 61	100—	100—	100—	10 000

Tabelle V.

Name der Bakterien	Name der Immunsere	
	Fa 85	Fa 87
	10 000	10 000
Fa 85	10 000	100—
Fa 87	100—	10 000

obigen Untersuchungen hervorgeht, wurden also die 58 Stämme von *Faecalis alkaligenes* agglutinatorisch in 15 Gruppen differenziert, deren 1. 3 Stämme, die 2. 30, die 3. 1, die 4. 3, die 5. 1, die 6. 1, die 7. 4, die 8. 6, die 9. 1, die 10. 1, die 11. 2, die 12. 1, die 13. 2, die 14. 1 und die 15. 1 enthielten. Es muß daher angenommen werden, daß die 2. Gruppe am häufigsten vorkommt. Wird ein Stamm aus den einzelnen Gruppen herausgenommen und in den ihm entsprechenden Seren gegenseitig agglutiniert, so wurde die gegenseitige Beziehung der einzelnen Gruppen ganz deutlich, wie Tabelle VI zeigt. Dabei erschien es uns sehr auffallend, daß die Stämme aus den einzelnen Gruppen gegenseitig gar nicht mitagglutinierten, so daß man vermuten darf, daß diese Mikroben ziemlich fest fixiert sind und wenig Variationserscheinungen zu zeigen scheinen. Doch wurde von mir bei 2 Stämmen aus den 2 Gruppen eine Variationserscheinung beobachtet: Die 2 Stämme aus der 3. und 4. Gruppe wurden nämlich nach 1 Jahre 2mal sowohl in homologen als auch in heterologen Seren agglutinatorisch untersucht und dabei bemerkt, daß sie nicht mehr in den homologen Seren agglutinierten, wogegen sie in den Seren aus der 2. Gruppe sehr stark, fast bis zum Titer, agglutiniert wurden.

Durch diesen Befund angeregt, zerlegte ich diese beiden Stämme in Kolonien, von welchen einzelne in den den einzelnen Stämmen entsprechenden Seren agglutinatorisch untersucht wurden. So wurden 100 Kolonien bei dem Stamm 14 aus der 3. Gruppe untersucht und dabei wurden, wenn auch ganz wenig, doch deutlich nachgewiesen, welche in den homologen Seren sehr stark, fast bis zum Titer, jedoch in den Seren aus der 2. Gruppe gar nicht reagierten. Viele Kolonien wurden dagegen in den Seren aus der 2. Gruppe sehr stark, in den homologen Seren aber gar nicht agglutiniert. Eine ähnliche Erscheinung konnte ich auch bei dem Stamm 22 aus der 4. Gruppe beobachten. Nach diesem Befund ist es erwiesen, daß unter den 2 Stämmen aus der 3. und 4. Gruppe zufällig viele Varianten neu gebildet werden, welche in den Seren aus der 2. Gruppe stark, in denen der eigenen Gruppe aber fast nicht reagieren konnten, die beiden Stämme in den eigenen Seren aber nicht mehr.

Zusammenfassung.

- 1) 58 Stämme von Bakterien, welche kulturell als *Bacillus faecalis alkaligenes* betrachtet werden müssen, wurden agglutinatorisch untersucht. —
- 2) Dabei ergab sich, daß sie im ganzen in 15 agglutinatorische Gruppen differenzierbar sind, welche sich gegenseitig scharf voneinander unterscheiden lassen. —
- 3) Merkwürdigerweise wurde dabei keine Mitagglutination beobachtet.

Tabelle VI.

Name der Bakterien	Name der Immunsera														
	G. I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV
I G. Fa 13	5000	10 000	10 000	10 000	10 000	10 000	5000	10 000	10 000	5000	10 000	10 000	10 000	10 000	10 000
II G. Fa 23	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—
III G. Fa 14	100—	10 000	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—
IV G. Fa 22	100—	100—	10 000	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—
V G. Fa 24	100—	100—	100—	10 000	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—
VI G. Fa 26	100—	100—	100—	100—	10 000	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—
VII G. Fa 67	100—	100—	100—	100—	100—	10 000	5000	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—
VIII G. Fa 31	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	10 000	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—
IX G. Fa 34	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	10 000	100—	100—	100—	100—	100—	100—
X G. Fa. 41	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	5000	100—	100—	100—	100—	100—
XI G. Fa 44	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	10 000	100—	100—	100—	100—
XII G. Fa 49	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	10 000	100—	100—	100—
XIII G. Fa 61	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	10 000	100—	100—
XIV G. Fa 85	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	10 000	100—
XV G. Fa 87	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	100—	10 000

Literatur.

- 1) Aoki u. Honda, Mitteil. a. d. Forschungsinstit. f. Seidenzucht. 4. 1919. p. 169. (Japanisch.) — 2) Aoki u. Iizuka, Tohoku Journ. Exp. Med. 1. 1920. p. 493. — 3) Matsui, Ibid. 5. 1924. p. 281. — 4) Matsui, Ibid. 7. 1926. p. 544. — 5) Aoki, Ibid. 2. 1921. p. 142. — 6) Kondo, Ibid. 6. 1925. p. 415. — 7) Aoki, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 98. 1926. S. 186. — 8) Aoki, Zeitschr. f. Immunitätsf. Bd. 50. 1927. S. 162. — 9) Klimenko, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 43. 1907. S. 755.

Nachdruck verboten.

Agglutinatorische Einteilung von *Coccobacillus foetidus ozaenae* von Perez.

[Aus dem bakteriologischen Institut der Universität Sendai
(Direktor: Prof. Dr. K. Aoki).]

Von Dr. G. Takayanagi.

Die Grundlage der Diagnose und Therapie auf dem Gebiet der Infektion muß die Bestimmung der immunisatorischen Einheit unter den Bakterien, welche als Erreger angenommen werden, bilden. Mit dieser Auffassung wurde von Aoki und seinen Schülern schon viel gearbeitet, so daß einige Bakterienarten, wie *Proteus*, *Dysenteriae*, *Pyocyaneus*, *Prodigosus*, *Paratyphusbazillen*, *Pneumokokken* und *Meningokokken* von ihnen in viele agglutinatorische Einheiten eingeteilt werden konnten. Als weiterer Beitrag zu dieser Frage wurde der sogenannte *Coccobacillus foetidus*, welcher von Perez als Erreger der Ozaena betrachtet worden ist, agglutinatorisch untersucht, weil mir die Gelegenheit geboten wurde, viele Stämme dieser Art von Bakterien aus dem reichen Krankenmaterial der hiesigen Ohrenklinik zu züchten.

Das Krankenmaterial, bei welchem diese Mikroben nachgewiesen wurden, war folgendes:

- 1) Eiter aus der Nasenhöhle von Ozaena.
- 2) Eiter aus Empyema Highmori.
- 3) Eiter aus Otitis media chronica.

In diesem Material wurden im ganzen 21 Stämme gefunden, unter denen sich 13 Stämme befanden, die wir schon vor 10 Jahren gezüchtet und seitdem aufbewahrt hatten. Ferner wurden noch 2 andere Stämme mituntersucht, von denen der eine als Amonstamm bezeichnet war. Sie wurden mir von Herrn Prof. Wada zur Verfügung gestellt, dem ich hier meinen verbindlichsten Dank ausspreche. Im ganzen wurden 23 Stämme zunächst darauf geprüft, ob sie ganz rein waren, worauf sie einzeln morphologisch und kulturell systematisch untersucht wurden.

Morphologisches: Kleine, kurze, Kokken ähnliche Bazillen, bei welchen wenige Stämme so lang wie beim Typhus und deren beide Enden abgerundet und wenige peritriche Geißeln vorhanden waren, welche durch Gram-Färbung nicht färbbar sind.

Kulturelles: 1) Auf Agarplatte bilden sie zarte, halb durchsichtige Kolonien, welche Typhuskolonien sehr ähnelten. — 2) Auf Gelatinplatte bildeten sie auch kleine rundliche Kolonien, welche während der Entwicklung je nach den Stämmen verschiedene Veränderungen zeigten, über welche unten näheres berichtet werden soll. — 3) Als Nährböden dienten: Kartoffel, Traubenzuckeragar, Neutralrotagar, Bouillon, Milch und Lackmusmolke, wobei kein Unterschied zwischen den Stämmen nachgewiesen wurde; sie bildeten auf Kartoffel graugelblichen, feuchten Belag, welcher viel dicker als der von Typhusbazillen war. Im Traubenzucker zeigten sie deutlich Gasbildung. Neutralrot wurde von ihnen etwas reduziert. In Bouillon wuchsen sie gut, doch war keine Hautbildung bemerkbar. Indolbildung war, wenn auch schwach, doch deutlich nachweisbar. Milch gerann nicht, wurde aber nach 2 Wochen allmählich peptonisiert. Lackmusmolke wurde von ihnen nicht verändert, jedoch wurde sie nach 2 Wochen allmählich blau. Nach diesen Ergebnissen scheinen unsere

Stämme mit den Originalstämmen von Perez ganz identisch zu sein. — 4) Verhalten gegen Gelatine: Auf 20proz. Gelatinplatte bildeten sie runde, zarte Kolonien, wie oben beschrieben, doch wurde bei gewissen Stämmen die merkwürdige Erscheinung beobachtet, daß die Kolonien während der Entwicklung immer viele Tochterkolonien an ihre Umgebung abgaben, so daß die Kolonien, welche im Anfang der Entwicklung scharf markiert erschienen, mit der Zeit verschleiert aussahen. Wurden diese verschleierten Kolonien mit der Lupe betrachtet, so sah man, daß die Originalkolonien von einem Kranze ganz kleiner Kolonien, sogenannter Schwärmkolonien, umgeben waren. Diese Erscheinung konnte ich bei der Stichtkultur auch nachweisen. Hierdurch konnte ich die Stämme der Perez-Bazillen in 2 Arten differenzieren, von denen die 1 Schwärmkolonien bildet, die andere dagegen nicht. Erstere enthielt 11, letztere 12 Stämme. Ueber die Verflüssigung der Gelatine wurde folgendes beobachtet: In der 20proz. Gelatine riefen die Stämme aus der 1. Gruppe, welche viele Schwärmkolonien neu bildeten, keine Verflüssigung hervor. Bei den anderen Stämmen aber, welche keine Schwärmkolonien abgegeben hatten, schienen die zarten Kolonien in ihrer Umgebung etwas eingesunken zu sein, so daß eine Unebenheit in der Oberfläche der Gelatineplatte bemerkbar wurde. Deshalb wurden die Stämme aus beiden Gruppen auf solchen Gelatinenährböden weiter gezüchtet, welche noch weniger Gelatine enthielten, nämlich 10 Proz. Dabei konnte ich deutliche Verflüssigung der Gelatine bei den Stämmen aus der 2. Gruppe beobachten, während bei den Stämmen aus der 1. Gruppe nur eine Senkung der Kolonie bemerkbar war, wie bei den Stämmen aus der 2. Gruppe bei 20proz. Gelatine. Deshalb wurden sie noch auf einem anderen Nährboden gezüchtet, der noch weniger Gelatine enthielt, nämlich nur 5 Proz. Dabei ergab sich, daß sie auch die Gelatine deutlich verflüssigten. Hier sei noch bemerkt, daß Schwärmkolonien in 10proz. Gelatine bei der 2. Gruppe schneller und deutlicher als bei der 1. Gruppe auftraten.

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, daß die Perez-Stämme die Fähigkeit haben, Gelatine zu verflüssigen. Was aber den Grad dieser Fähigkeit anbelangt, so wurden die Stämme dabei in 2 Gruppen differenziert, von denen die eine stark,

Tabelle I.

Gruppe	Prozent der Gelatine		
	Verflüssigung der Gelatine		
	20 Proz.	10 Proz.	5 Proz.
I.	—	±	+
II.	±	+	++

die andere schwach dazu befähigt ist (Tab. I). Obgleich Shiga bei gewissen seiner Stämmen dieses Verflüssigungsvermögen bemerkt hatte, hat er das doch als ungewöhnlich betrachtet, weil er von Anfang an der Ansicht war, daß diese Mikroben diese Eigenschaft nicht besäßen.

Agglutinatorisch: 1) Dann wurden sie in unseren repräsentierenden Seren, nämlich Paratyphus B, Paratyphus A, Mäusetyphus, Hogchoiera, Newport, L, Stanley, Gärtner, Abortus equi, Typhus Ht, Dysenterie, Proteus, Pyocyaneus und Faecalis agglutinatorisch untersucht. Dabei ergab sich, daß sie in allen Seren nicht über 1 : 50 beeinflußt wurden. — 2) Ferner wurden den 23 Stämmen entsprechende Seren bei Kaninchen hergestellt und die Aufschwemmungen der einzelnen Stämme bei 60° 15 Min. lang erhitzt. Diese Aufschwemmungen wurden Kaninchen einmal in der Woche in folgenden

Name der											
	Na. 1	Na. 2	Na. 3	Na. 4	Na. 5	Na. 6	Na. 7	Na. 8	Na. 9	Na. 10	Na. 11
Name der Bakterien	2000	1000	1000	2000	2000	10 000	1000	2000	2000	2000	2000
Na. 1	2000	1000	1000	2000	2000	10 000	100	100	100	50	200
„ 2	2000	1000	1000	2000	2000	10 000	100	100	100	50	200
„ 3	2000	1000	1000	2000	2000	10 000	100	100	100	50	200
„ 4	2000	1000	1000	2000	2000	10 000	100	100	100	50	200
„ 5	2000	1000	1000	2000	2000	10 000	100	100	100	50	200
„ 6	2000	1000	1000	2000	2000	10 000	100	100	100	50	100
„ 7	2000	1000	1000	1000	1000	2000	1000	2000	2000	2000	2000
„ 8	2000	1000	1000	1000	1000	2000	1000	2000	2000	2000	2000
„ 9	2000	1000	1000	1000	1000	2000	1000	2000	2000	2000	2000
„ 10	2000	1000	1000	1000	1000	2000	1000	2000	2000	2000	2000
„ 11	2000	1000	1000	1000	1000	2000	1000	2000	2000	2000	2000
„ 12	100	50	50	50	50—	100	100 ±	100	100	100	50
„ 13	100	50	50	50	50	100	100	100	100	100	50
„ 14	2000	1000	1000	2000	2000	2000	1000	50	500	1000	1000
„ 15	2000	1000	1000	2000	2000	2000	1000	50	500	1000	1000
„ 16	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—
„ 17	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—
„ 18	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—
„ 19	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—
„ 20	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—
„ 21	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—
„ 22	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—
„ 23	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—

Dosen hintereinander eingespritzt: $\frac{1}{20}$, $\frac{1}{10}$, $\frac{1}{5}$, $\frac{1}{2}$, 1 und 2 Agar. Die Tiere vertrugen diese Einspritzungen gut. Der Titer der Agglutination trat bei den meisten Kaninchen von 1:1000—1:2000, bei wenigen Tieren von 1:5000 bis 1:10000 stark auf. Mit diesen Seren wurde die gekreuzte Agglutination ganz systematisch ausgeführt. Die Stämme, welche dabei in allen Seren im gleichen Verhältnis reagierten, wurden als ein und dieselbe Art betrachtet und zu ammen-gestellt. Auf diese Weise konnte ich die 23 Stämme von *Bacillus Perez* in 8 Gruppen einteilen (Tab. II): Die 1. Gruppe enthält 6 Stämme, die zweite 5, die dritte 2, die vierte 2, die fünfte 5, die 6., 7. und 8. je 1 Stamm. 6 Stämme, welche als zu der 1. Gruppe gehörig festgestellt waren, agglutinierten nicht nur gegenseitig gleich stark, sondern auch in den Seren aus den anderen Gruppen immer im gleichen Verhältnis, so daß sie agglutinatorisch als 1 Art zu betrachten sind. 5 Stämme aus der 2. Gruppe agglutinierten auch gegenseitig ganz gleich, so daß sie als 1 Art angenommen werden müssen. Wenn man sie aber den Seren aus den anderen Gruppen gegenüber genau betrachtet, so wird es klar, daß sie sich den Seren aus der 7. und 8. Gruppe gegenüber nicht gleichartig verhielten und dabei wieder in 2 Untergruppen differenziert wurden. Die 1. Untergruppe, welche 3 Stämme enthielt, agglutinierte darin gar nicht, 2 Stämme aus der 2. dagegen bis zum Titer, während die Stämme aus der 3. in allen Seren gleichagglutinierten. Ebenso agglutinierten die Stämme aus der 4. und 5. Gruppe. Die 6., 7. und 8. Gruppe enthielten je 1 Stamm. Die mitagglutinatorische Beziehung dieser einzelnen Gruppen zeigt Tabelle II. Die Stämme aus der 1. Gruppe wurden von den Seren aus der 6. Gruppe bis zum Titer beeinflusst, jedoch der Stamm aus der 6. Gruppe von den Seren aus der 1. Gruppe gar nicht. Die Stämme aus der 2. Gruppe agglutinierten in den Seren aus der 1. und

belle II.

Immunsera.

Na. 12	Na. 13	Na. 14	Na. 15	Na. 16	Na. 17	Na. 18	Na. 19	Na. 20	Na. 21	Na. 22	Na. 23
5000	10 000	10 000	5000	2000	5000	5000	5000	5000	2000	2000	2000
50	50	50	100	50	50	50	50	50	2000	50	50
50	50	50	100	50	50	50—	50	50	2000	50	50
50	50	50	200	50	50	50	50	50	1000	50	50
50	50	50	100	50	50	50—	50	50	1000	50	50
50	50	50	100	50	50	50	50±	50	1000	50	50
50	50	50	100	50±	50	50	50	50	1000	50	50
50	50—	50	100	50—	50	50	50	50	2000	50	50—
50	50—	50	100	50	50	50	50	50	1000	50	50
50	50—	50	100	50	50	50	50	50	1000	50	50—
50	50—	50	100	50	50	50	50	50—	1000	2000	2000
50	50—	50	100	50	50	50	50	50	1000	2000	2000
5000	10 000	50	100	50	50	50	50	50	100	2000	2000
5000	10 000	50	100	50	50	50	50	50	100	2000	2000
2000	2000	10 000	5000	50	50	50	50	50	1000	1000	2000
2000	2000	10 000	5000	50	50	50	50	50	1000	1000	2000
50—	50—	50—	50—	2000	5000	5000	5000	5000	50—	50—	50—
50—	50—	50—	50—	2000	5000	5000	5000	5000	50—	50—	50—
50—	50—	50—	50—	2000	5000	5000	5000	5000	50—	50—	50—
50—	50—	50—	50—	2000	5000	5000	5000	5000	50—	50—	50—
50—	50—	50—	50—	2000	5000	5000	5000	5000	50—	50—	50—
50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—	2000	50—	50—
50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—	2000	50—
50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—	50—	2000

6. Gruppe sehr stark, bis zum Titer. Doch wurden die Stämme aus der 1. Gruppe von den Seren aus der 2. Gruppe ausnahmslos ganz schwach, dagegen die Stämme aus der 6. Gruppe gar nicht beeinflusst. Die Stämme aus der 3. Gruppe wurden in den Seren der 7. und 8. Gruppe bis zum Titer, jedoch die der 7. und 8. Gruppe in den Seren der 3. gar nicht beeinflusst. Die Stämme aus der 4. Gruppe wurden von den Seren aus der 1., 2., 3., 6., 7. und 8. sehr stark, manchmal bis zum Titer agglutiniert, jedoch wurden die aus der 1., 2., 3., 6., 7. und 8. Gruppe von den Seren aus der 4. Gruppe fast nicht beeinflusst. Die Seren der 6. Gruppe agglutinierten die Stämme aus der 1., 2. und 4. Gruppe sehr stark, bis zum Titer, wogegen der Stamm der 6. Gruppe von keinen Seren aus derselben Gruppe beeinflusst wurde. Ebenso verhielten sich die Seren aus der 7. und 8. Gruppe, in der die Stämme aus der 2., 3. und 4. Gruppe bis zum Titer agglutiniert wurden, jedoch konnten die Seren aus der 2., 3. und 4. Gruppe die Stämme aus der 7. und 8. gar nicht beeinflussen. Dabei muß bemerkt werden, daß die Stämme aus der 2. Gruppe durch die Seren aus der 7. und 8. Gruppe in 2 Untergruppen differenziert wurden, wie oben beschrieben ist. — 3) Wird diese agglutinatorische Einteilung mit der Differenz der anderen, oben genau auseinandergesetzten Eigenschaften verglichen, so ergibt sich folgendes: 6 Stämme aus der 1. Gruppe zeigten gleichartige kurze Stäbchenform, ebenso die aus der 2. und 3. Gruppe. Die 2 Stämme aus der 4. zeigten sich gegenseitig ganz verschieden, so daß der 1 Stamm Nr. 11 mehr wie Typhusbazillen aussah. Ebenso war es bei den 2 Stämmen aus der 5. Gruppe der Fall. Die Stämme aus den übrigen 4 Gruppen, der 5., 6., 7. und 8., sahen genau so aus, wie die aus der 1. und 2. Gruppe. Es scheint daher die Formdifferenz zwischen den Stämmen keine Beziehung zur agglutinatorischen Einteilung zu haben. Werden die

Stämme aus den einzelnen Gruppen nach dem Verhalten gegen Gelatine betrachtet, so ergab sich, daß die agglutinatorische Beziehung mit dem Verflüssigungsvermögen nicht zusammenhängt, wie Tabelle III zeigt. So wurden unter 5 Stämmen aus der 2. Gruppe 2 Sorten nachgewiesen, welche bezüglich der Verflüssigung ganz verschieden waren. Ebenso wurden 2 Sorten unter den

Tabelle III.

Aggl. Einteilung	Name der Stämme	Verflüssigung der Gelatine	Einteilung nach Gelatine
II	Na. 7	stark	II
	„ 8	„	II
	„ 9	„	II
	„ 10	„	II
	„ 11	schwach	I
	„ 16	stark	II
V	„ 17	schwach	I
	„ 18	„	I
	„ 19	„	I
	„ 20	stark	II

5 Stämmen aus der 5. Gruppe beobachtet (Tab. III). Umgekehrt sind die 11 Stämme, welche Gelatine schlecht verflüssigten, agglutinatorisch in 7 Gruppen, nämlich die 2., 3., 4., 5., 6., 7. und 8., die übrigen 12 Stämme, welche Gelatine

Tabelle IV.

Einleitung nach Gelatine	Stark verflüssigend										Schwach verflüssigend												
	Na. 1	Na. 2	Na. 3	Na. 4	Na. 5	Na. 6	Na. 7	Na. 8	Na. 9	Na. 10	Na. 16	Na. 20	Na. 11	Na. 12	Na. 13	Na. 14	Na. 15	Na. 17	Na. 18	Na. 19	Na. 21	Na. 22	Na. 23
Aggl. Einteilung	I	I	I	I	I	I	II	II	II	II	V	V	II	III	III	IV	IV	V	V	V	VI	VII	VIII

stark verflüssigten, in 3 Gruppen, nämlich die 1., 2. und 5., einzuteilen (Tab. IV). Deshalb wurden Stämme aus 2 verschiedenen agglutinierenden Gruppen in ein und derselben Sorte nachgewiesen, welche durch das Verflüssigungsvermögen der Gelatine bestimmt waren. Infolgedessen kann man wohl annehmen, daß das Gelatineverhalten nicht immer mit der agglutinatorischen Einteilung zusammenhängt, wie das Aoki schon bei der agglutinatorischen Einteilung von Proteus-Bazillen bemerkt hat. Auch Shiga konnte Ähnliches beobachten.

Zusammenfassung und Schlußbetrachtung.

Nach allen obigen Untersuchungen ist erwiesen, daß proteusartige Bakterien, welche bei Ozaena häufig nachgewiesen werden und die von Perez als Erreger von Ozaena betrachtet wurden, zwar morphologisch und biologisch fast einheitlich, jedoch agglutinatorisch mehrheitlich sich verhielten. So wurden unsere 23 Stämme in 8 Gruppen scharf differenziert, von denen einige einseitig stark agglutinierten. Shiga konnte sie dagegen agglutinatorisch in 2 Sorten differenzieren. Was die Gelatineverflüssigung anbelangt, so wurden sie in 2 Gruppen differenziert. 11 Stämme, welche Gelatine stark verflüssigten, wurden agglutinatorisch in 3 Gruppen, nämlich die 1., 2. und 4., und die 12 Stämme, welche Gelatine schwach verflüssigten, in 7 Gruppen, nämlich die

2., 3., 4., 5., 6., 7. und 8., eingeteilt. Deshalb zeigten die Stämme aus der 2. und 4. Gruppe keine Uebereinstimmung der agglutinatorischen Einteilung mit den Gelatineverflüssigungsvermögen. Eine ähnliche Erscheinung wurde von Aoki bei *Proteus* und *Pyocyaneus* beobachtet. — Zum Schlusse möchte ich bemerken, daß diese Art von Bakterien in der Nasen- und Ohrengegend nicht selten nachweisbar sind, weil sie bei uns im Institut nicht nur im Ozaenamaterial, sondern auch im Eiter aus Otitis media und Empyema Highmori nicht selten gefunden wurden.

Literatur.

1) Aoki u. Honda, Mitteil. a. d. Forschungsinstitut f. Seidenzucht. Bd. 4. 1919. S. 169. [Japanisch]. — Aoki u. Iizuka, Tohoku Journ. Exp. Med. Vol. 1. 1920. p. 493. — 3) Matsui, Ibid. Vol. 5. 1924. p. 281. — 4) Ders., Ebenda. Vol. 7. 1926. p. 544. — 5) Aoki, Ebenda. Vol. 2. 1921. p. 142. — 6) Kondo, Ebenda. Vol. 6. 1925. p. 415. — 7) Aoki, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 98. 1926. S. 186. — 8) Ders., Ztschr. f. Immunitätsf. Bd. 50. 1927. S. 162. — 9) Shiga, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 88. 1922. S. 521.

Nachdruck verboten.

Ueber die Verbreitung von Darmparasiten in der Türkei.

Von **Ismail Hakki,**

Professor für Parasitologie an der medizinischen Fakultät in Konstantinopel.

Vom Mai 1926 bis November 1927 habe ich 800 Stühle untersucht, um die menschlichen Darmparasiten zu bestimmen. Ich glaube, daß es von Wert ist, die Ergebnisse hier mitzuteilen, denn bis jetzt ist in Deutschland wenig über die parasitologischen Verhältnisse in der Türkei bekannt geworden. Ich glaube, daß es das ertemal ist, daß Massununtersuchungen von Stühlen in der Türkei vorgenommen worden sind. Von den Ektoparasiten des Menschen habe ich schon früher die Mücken Anatoliens studiert und die Ergebnisse in der Pariser Presse Médicale (20. 4. 1926) mitgeteilt.

An Eingeweideparasiten des Menschen habe ich folgende Protozoen und Myzeten gefunden:

Parasit	positive Stühle	Prozent
<i>Entamoeba coli</i>	50	$6\frac{2}{8}$
„ <i>dysenteriae</i>	25	$3\frac{1}{8}$
<i>Chilomastix mesnili</i>	35	$4\frac{3}{8}$
<i>Trichomonas hominis</i>	20	$2\frac{4}{8}$
<i>Giardia intestinalis</i>	50	$6\frac{2}{8}$
<i>Blastocystis hominis</i> (der einzige Pilz, der beobachtet wurde)	70	$8\frac{6}{8}$

Weder Spirochäten noch Coccidien noch Balantidien wurden gefunden.

Helminthen wurden durch Auffinden der Eier und gelegentlich der erwachsenen Würmer festgestellt:

Eier von	positive Stühle	Prozent
<i>Hymenolepis nana</i>	30	$3\frac{6}{8}$
<i>Bothriocephalus latus</i>	60	$7\frac{4}{8}$
<i>Ascaris lumbricoides</i>	150	$18\frac{6}{8}$
<i>Oxyuris vermicularis</i>	180	$22\frac{4}{8}$
<i>Necator americanus</i>	25	$3\frac{1}{8}$
<i>Ankylostoma duodenale</i>	5	$\frac{5}{8}$
<i>Trichocephalus trichiurus</i>	170	$21\frac{2}{8}$

Oft kamen mehrere Parasiten vor; so fanden sich Trichocephalus- und Ascaris-Eier zusammen. Manche Stühle waren überhaupt frei. Die Stühle stammten von Kindern von 10—15 Jahren und von Erwachsenen.

Es braucht nicht erst bemerkt zu werden, daß ich oft die *Taenia saginata* gefunden habe, selten die *T. solium*, die man zu obiger Liste hinzufügen muß.

Ich hoffe, diese Liste in Zukunft vervollständigen zu können, doch gibt sie auch so schon eine Vorstellung. Die Hälfte der Stühle stammte von Leuten, die nicht aus Konstantinopel waren, sondern aus anderen Provinzen der Türkei kamen. Jeder Stuhl wurde frisch in physiol. und in Lugolscher Lösung untersucht und in Präparaten, die mit Eisenhämatoxylin gefärbt waren. Die Mehrzahl dieser 800 Stühle kam von Leuten, die wenigstens scheinbar gesund waren, die übrigen hatten gewisse Darmbeschwerden.

Nachdruck verboten.

Ueber Trypanosomen.

VII. Mitteilung: Blutzuckerwerte bei experimentell mit *Mal de Caderas* infizierten Tieren.

[Aus dem Bakteriologischen Institut der tierärztlichen Hochschule zu Montevideo (Direktor: Prof. Dr. Kurt Schern).]

Von Prof. Dr. **Kurt Schern** und Dr. **Libero Rossi-Lema**.

Mit 3 Kurven im Text.

In Bd. 96. H. 5/8. 1926 dieses Centralblattes hat der eine von uns (Schern) in 6 Mitteilungen über seine letzthin ausgeführten Trypanosomenstudien berichtet, bei denen es sich zunächst hauptsächlich darum gehandelt hat, das seinerzeit von dem genannten Autor im Uhlenhuthschen Laboratorium gefundene Trypanosomenphänomen so weit wie möglich aufzuklären. Auch in Nr. 18 der Deutsch. tierärztl. Wochenschr. (Jhrg. 35. 1927. S. 283—286) ist von Schern zusammenfassend und teilweise unter Angabe weiterer Versuchsergebnisse berichtet worden.

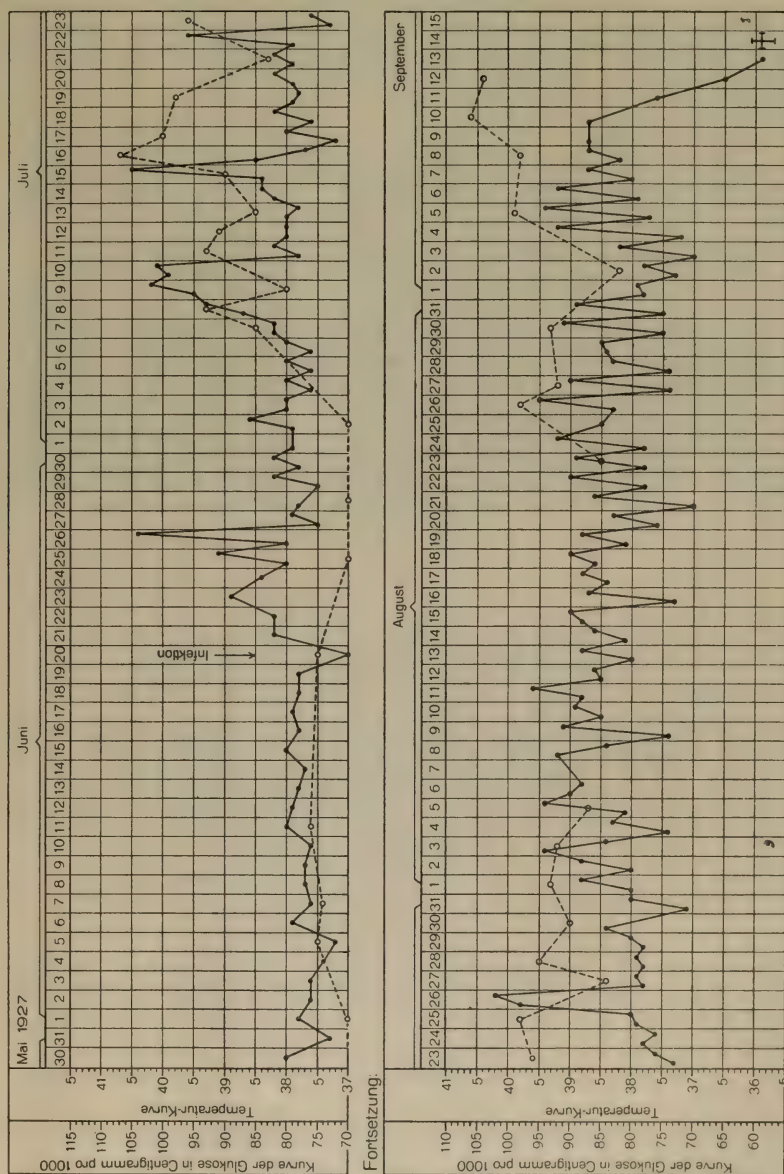
Die erwähnten Beobachtungen haben Dubois (Bakteriol. Institut der Universität Läden) veranlaßt, gleichartige Untersuchungen anzustellen, worüber er in den C. r. Soc. de Biol. T. 95. 1926. Nr. 31 eine Mitteilung gemacht hat („Le phénomène de Kurt Schern dans les trypanosomiasés“). Dubois bestätigt die Angaben von Schern ebenso wie Savina vom Instituto Bacteriologica del Departamento Nacional de Higiene in Buenos-Aires (C. r. Soc. de Biol. T. 97. 1927. Nr. 3).

Es dürfte heute wohl als feststehend gelten, daß auf Grund der erwähnten Arbeiten ein neuartiger Einblick in einen Teil der Pathogenese der Trypanosomiasen und Spirochätosen getan ist, und daß das Phänomen der Trypanosomen, welches von anderen Autoren als Schernsches Phänomen bezeichnet worden ist, die Ursache dazu gewesen ist, das Problem der genannten Krankheiten auch als ein solches des Stoffwechsels zu betrachten, nachdem Schern die Bedeutung des Zuckers für den Haushalt der Trypanosomen und Spirochäten als einen entscheidenden Faktor erkannt hat.

Es entstand die Aufgabe, systematisch die Blutzuckerwerte bei Tieren zu bestimmen, die experimentell mit den genannten Parasiten infiziert worden waren. In dieser Beziehung hat Schern seine ersten Befunde gelegentlich eines

Vortrages mitgeteilt, den er im August 1926 vor der Mikrobiologischen Gesellschaft in Montevideo gehalten hat.

Es war von Bedeutung, diese Befunde zu erweitern. Deshalb ist u. a. auch von uns ein 4jähriges männliches gut genährtes Pferd mit 0,5 cem einer Trypanosomenaufschwemmung am 20. 6. 1927 intravenös infiziert worden (Mal de

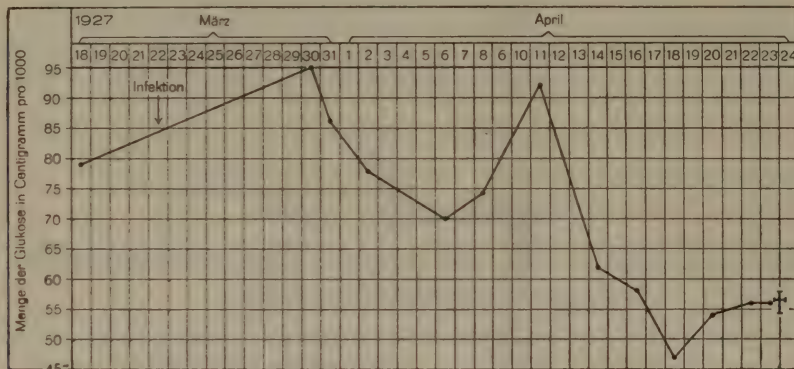


Kurve 1.

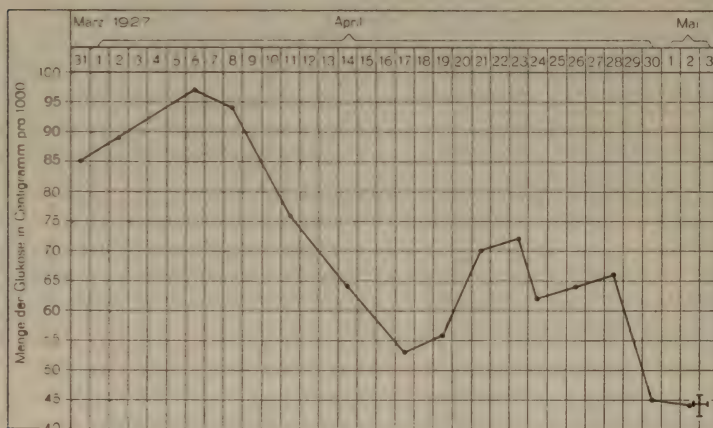
Caderas-Trypanosomen, Mäuseblut). Der Nüchternblutzucker des Pferdes lag zwischen 70 und 76 Centigramm pro Liter Blut. Der Blutzucker (s. Kurve 1) ist von uns bei allen diesen Untersuchungen nach der Methode von Epstein bestimmt worden, welche nach den Anschauungen erfahrener Kliniker hinsichtlich der Sicherheit ihrer Resultate unerheblich von der Methode Bang abweicht. Die Blutzuckerwerte fallen zunächst vom Normalwert des Zuckers geringgradig ab,

dann steigt der Gehalt des Blutes an Zucker mit fortschreitender Infektion allmählich an, er hat am 16. Juli 1927 seinen Höhepunkt mit 107 Centigramm erreicht. Dieser Wert übertrifft den ungefähr normalen Blutzuckerwert um 33 Centigramm. Danach fällt der Zuckerwert, aber er bleibt dauernd vermehrt und schwankt hin und her, ähnlich wie die Temperaturen.

Im Laufe der Infektion werden die typischen Erscheinungen des Mal de Caderas bei dem Tiere beobachtet, auch sind wiederholt durch Verimpfung des Blutes an Mäuse die Trypanosomen nachgewiesen worden, so daß der klinische Befund gesichert ist.



Kurve 2.



Kurve 3.

Leider mußte das Pferd zum Zwecke eines besonderen therapeutischen Versuches mit einem Mittel am 13. 9. 1927 intravenös injiziert werden, so daß danach die Blutzuckerkurve nicht weiter bearbeitet werden konnte. Das Tier verendete nach der Injektion in der Nacht vom 13. zum 14. 9. Bei der Obduktion sind die Veränderungen des Mal de Caderas festgestellt worden, soweit man von solchen makroskopischen Veränderungen sprechen kann.

Auch bei Kaninchen sind von uns neuerdings die Blutzuckerwerte nach erfolgter Mal de Caderasinfektion systematisch mit der oben genannten Methode verfolgt worden (s. Kurve 2 und 3). Nach unseren Beobachtungen scheint

es beim Kaninchen eine gewisse Bedeutung zu haben, sofern man deutliche Ausschläge der Blutzuckerwerte erhalten will, daß die Infektion verhältnismäßig schnell verläuft, aber Sicheres können wir darüber auch nicht angeben. Auch scheint es, als ob niedrige Außentemperaturen den Verlauf der Infektion hinauszögern. Ganz deutlich tritt die Hyperglykämie hervor, der die finale Glykopenie mit dem Tode folgt.

Zum Vergleiche haben wir die Blutzuckerkurven von anderen, normalen Kaninchen aufgestellt. Es findet sich oft in der Literatur die Mitteilung, daß die Blutzuckerwerte beim normalen Kaninchen schon sehr erheblich schwanken. Das Wesentliche ist, daß die Tiere wirklich nüchtern sind vor der Blutentnahme und daß die Tiere nicht gefüttert worden sind.

Leider ist es uns bis jetzt noch nicht möglich gewesen, andere, sehr wichtige Kontrollversuche in systematischer Weise durchzuführen. Die Bestimmung der Blutzuckerwerte bei anderen, z. B. auch bakteriellen Infektionen. Auch diese Untersuchungen sind mit Rücksicht auf ihre Bedeutung bereits in Angriff genommen.

Darüber konnten wir uns noch nicht Klarheit verschaffen, wie weit das Insulin die genannten Infektionen beeinflusst, obwohl Schern in dieser Richtung schon seinerzeit entsprechende Versuche angestellt hat. Dagegen hat Sarino (l. c.) in seinen Arbeiten mitgeteilt, daß sich unter dem Einfluß des Insulins die Anzahl der Trypanosomen im infizierten Organismus verringert.

Unsere Versuche werden fortgesetzt. Wir haben geglaubt, das Wesentliche unserer bisherigen Resultate mitteilen zu sollen.

Nachdruck verboten.

Studien über den Mechanismus der Trichinelleninfektion.

IV. Mitteilung: Das Verhalten gelähmter Muskeln.

[Aus dem Hygienischen Institut der Universität Basel (Vorsteher: Prof. Dr. R. Doerr).]

Von **E. Berger** und **Ad. Stähelin**.

Nach den herrschenden Auffassungen dringen die im Blute zirkulierenden Trichinellen in häufig betätigte Muskeln (Kau-, Augen-, Kehlkopf-, Zungen-, Atem-Muskeln) in erheblich größerer Zahl ein als in Muskeln, welche bei der betreffenden Tierspezies nur gelegentlich in Aktion treten. Selbst bei hochgradig infizierten Wirten sind derartige Unterschiede der Besiedelung noch immer zu konstatieren; beim Meerschweinchen z. B. werden die Masseteren öfter und weit stärker befallen als die Muskeln der vorderen und hinteren Extremitäten. Stäubli suchte diese Beobachtung durch die reichlichere Durchblutung der arbeitenden Muskeln bzw. durch die Einschwemmung einer größeren Zahl kreisender Embryonen zu erklären, also durch ein rein mechanisches (hämodynamisches) Moment; die Untersuchungen von Flury, welcher für die „Myotropie“ der Trichinenembryonen den Glykogengehalt der quergestreiften Muskulatur resp. das Glykogenbedürfnis der Parasiten verantwortlich machen will, würden dazu führen, das Hauptgewicht auf den verschiedenen Stoffwechsel tätiger und ruhender Muskeln zu verlegen,

so daß in erster Linie der differente Bestand an chemischen, anlockend wirkenden Substanzen in Frage käme.

Gegen beide Hypothesen wurden von R. Doerr, Ad. Stähelin, J. H. Lewis mehrfache Einwände erhoben, unter denen die größte Beweiskraft dem Verhalten gelähmter Muskeln zukommt, welche nach den Angaben von Doerr und Walthard (s. Ad. Stähelin, l. c.) ebenso stark von der Trichinelleninvasion betroffen werden wie die gleichnamigen, nichtgelähmten Muskeln der anderen Körperhälfte desselben enteral infizierten Wirtstieres. Diese Feststellung erschüttert nämlich die Basis der bisherigen Prädispositionstheorien: den als sichere Prämisse betrachteten Konnex zwischen Muskelarbeit und lokaler Disposition für die Besiedelung mit Trichinellen. Wie aber in der Mitteilung von Ad. Stähelin auseinandergesetzt wurde, haben Doerr und Walthard mehrere Faktoren, von denen das Endergebnis beeinflußt werden konnte, nicht geprüft, eine Lücke, welche durch die nachfolgenden Versuche zum Teile ausgefüllt werden soll.

Die Versuche zerfallen in zwei Serien. Bei der ersten Serie wurden die Muskeln einer hinteren Extremität durch Neurektomie des Nervus ischiadicus gelähmt und die infizierende Verfütterung trichinigen Fleisches am folgenden Tage vorgenommen und nach weiteren 8 Tagen wiederholt. In der zweiten Serie lag zwischen der einseitigen Neurektomie und der infizierenden Mahlzeit ein Zwischenraum von 3 Wochen. Die Versuchstiere wurden in beiden Serien so lange am Leben gelassen, bis die Entwicklung der in die Muskeln eingedrungenen Trichinellen beendet bzw. bis zum eingekapselten Stadium vorgeschritten sein konnte, um den mikroskopischen Nachweis des Invasionszustandes zu erleichtern.

Die Lähmung wurde am lebenden Tiere (es handelte sich um Meerschweinchen und Ratten) klinisch durch die Funktionsstörung, am getöteten Tiere durch Messung der Atrophie mit Hilfe genauer Wägungen der in Betracht kommenden Muskeln, sowie mikroskopisch durch den Nachweis der Verschmälerung der Muskelfasern festgestellt. Der Zustand der Muskeln, wie er post mortem ermittelt werden konnte, war natürlich nicht mehr der gleiche, wie er zur Zeit der Trichinelleninvasion bestanden hatte; die eingetretene Atrophie sollte auch nur — das gilt vor allem für die erste Versuchsserie — als sicherer Beweis dienen, daß der Muskel durch die Neurektomie tatsächlich gelähmt, d. h. außer Funktion gesetzt worden war.

Bei der Beurteilung des Invasionszustandes wurde auch diesmal auf eine Auszählung sämtlicher, in einem bestimmten Muskel vorhandener Trichinellen verzichtet, einerseits wegen der bedeutenden technischen Schwierigkeiten, dann aber auch, weil die auf diese Weise zu erreichende Genauigkeit nur problematischen Wert gehabt hätte. In früheren Experimenten (vgl. die III. Mitteilung) konnten wir uns überzeugen, daß die Ansiedelung von intrakarotal injizierten Trichinellen in der Muskulatur der hinteren Extremitäten normaler (nicht gelähmter) Meerschweinchen keineswegs derart erfolgt, daß man beiderseits gleich viele Trichinellen vorfindet; vielmehr bestanden zwischen links und rechts auffällige und nicht erklärbare Differenzen. Ferner muß man sich darüber a priori klar sein, daß durch die völlige Lähmung eines Muskels extreme Verhältnisse geschaffen werden, welche für das normale Tier gar nicht in Betracht kommen. Zwischen einem paralytischen, rasch atrophierenden Muskel und einem normalen, der nur wenig Arbeit zu leisten hat, existiert ein gewaltiger Unterschied, der sich nicht nur in der Vollständigkeit der Funktionsausschaltung, sondern auch in der morphologischen Struktur des Gewebes zum Ausdruck gelangt. Eine identische Besiedelungsdichtigkeit gelähmter und kontralateraler, nicht gelähmter Muskeln war daher unter den

von uns gewählten Bedingungen von vornherein nicht zu erwarten. Wenn aber die Muskularbeit die Trichineninvasion wirklich begünstigt, müßte ihre gänzliche Ausschaltung die Ansiedelung der Trichinellen auf ein Minimum herabdrücken oder völlig verhindern. Wir begnügten uns daher mit bloßen Abschätzungen der Besiedelungsdichte, wie sie in Schnittpräparaten durch die gehärteten Muskeln zutage trat, und suchten auf diesem Wege folgende Fragen zu entscheiden:

1) Kann ein gelähmter oder ein bereits hochgradig atrophischer Muskel, der schon unter normalen Bedingungen (d. h. im nicht gelähmten Zustande) nicht zu den „bevorzugten“ gehört, von Trichinellen besiedelt werden und in welchem Grade?

2) Welchen Anteil nimmt an dem Resultat die bloße Lähmung (Funktionsausschaltung) und inwiefern beeinflußt die Atrophie das Ergebnis?

3) Sind die Unterschiede zwischen den gelähmten und den gleichnamigen nichtgelähmten Muskeln stets gleichsinnig und konstant?

1. Versuchsserie.

Hier wurde ein möglichst langes Stück des Nervus ischiadicus reseziert, in einem Falle auch ein Stück des N. femoralis. Am 1. und 8. Tage nach der Operation erfolgte je eine Zwangsfütterung mit trichinigem Fleisch. 21 Tage nach der ersten infizierenden Mahlzeit wurden die Tiere getötet, die in Betracht kommenden Muskeln zunächst gewogen, dann fixiert, gehärtet, geschnitten und die Schnitte mit Hämalaun-Eosin gefärbt. Da die Invasion der Trichinellen in die Muskeln etwa am 7.—9. Tage nach der infizierenden Mahlzeit beginnt, mußte die Lähmung zu dieser Zeit schon mindestens 1 Woche bestanden haben; es hatte daher auch zweifellos die Atrophie bereits eingesetzt bzw. gewisse Fortschritte gemacht.

Versuche.

a) Meerschweinchen J1; Exstirpation des l. Ischiadicus am 19. 10. 27; infizierende Mahlzeiten am 20. und 29. 10. Tötung des Tieres am 11. 11. (21 Tage nach der ersten infizierenden Mahlzeit). Befund:

	Gewicht:	Besiedelung:
Linker (gelähmter) Gastrocnemius:	0,45 g	mäßig zahlreiche, eingek. Trich.
Rechter (normaler) „	0,70 „	ca. doppelt so viel wie links.

b) Meerschweinchen J2; dieselben Versuchsbedingungen wie bei J1. Befund:

	Gewicht:	Besiedelung:
Linker (gelähmter) Gastrocnemius;	0,78 g	mäßig zahlreiche, eingek. Trich.
Rechter (normaler) „	1,89 „	ebenso viel wie links.

c) Meerschweinchen J3, behandelt wie die vorhergehenden Tiere. Befund:

	Gewicht:	Besiedelung:
Linker Gastrocnemius:	1,00 g	reichlich eingek. Trichinen;
Rechter „	1,79 „	kein deutlicher Unterschied.

d) Ratte, behandelt wie die Meerschweinchen. Befund:

	Gewicht:	Besiedelung:
Linker Gastrocnemius:	0,44 g	spärlich eingekapselte Trichinen;
Rechter „	0,92 „	rechts etwas zahlreicher wie links.

e) Meerschweinchen T.N.1. Resektion des l. Ischiadicus und l. Femoralis.

	Gewicht:	Besiedelung:
Linker Gastrocnemius:	0,65 g	mäßig zahlreiche Trichinen;
Rechter „	1,31 „	kein Unterschied.
Linker Tibialis posticus:	—	rechts doppelt so viel Trichinen
Rechter „	—	wie links.

2. Versuchsserie.

In dieser Serie lag zwischen der Nervenresektion und der infizierenden Fütterung eine Zeitspanne von 22, zwischen Nervenresektion und Einwande-

rung der Trichinellen in die Muskeln ein Intervall von 30 Tagen. Die Muskelatrophie mußte daher, wie die Wägungen und die histologischen Befunde der ersten Serie beweisen, schon so weit fortgeschritten sein, daß die gelähmten Muskeln mindestens 50 Proz. ihres ursprünglichen Gewichtes verloren hatten, bevor die Invasion der Trichinellen beginnen konnte. 30 Tage nach der Fütterung wurden die Meerschweinchen durch Nackenschlag getötet und einzelne der gelähmten Muskeln mit den kontralateralen hinsichtlich ihres Gewichtes, der histologischen Veränderungen und der Dichte der Trichinenbesiedelung verglichen.

Versuche.

a) Meerschweinchen J 4; ausgedehnte linksseitige Resektion des Ischiadicus am 30. 11., infizierende Mahlzeit am 22. 12., Tötung am 21. 1. 1928.

	Gewicht:	Besiedelung:
Linker Gastrocnemius	0,95 g	{ spärliche Trichinen, kein Unterschied zwischen l. und r.
Rechter "	2,49 "	
Linker Tibialis post.	0,09 "	{ ganz vereinzelte Trichinen spärliche Trichinen, mehr als links
Rechter "	0,35 "	
Linker "	0,22 "	{ spärliche Trichinen, rechts etwas zahlreicher als links.
Rechter "	0,63 "	

b) Meerschweinchen J 5, behandelt wie J 4. Befund:

Linker Gastrocnemius	0,95 g	{ mäßig r. Trichinen, links etwas weniger als rechts.
Rechter "	2,49 "	
Linker Tibialis post.	0,10 "	{ ganz vereinzelte Trichinen spärliche Trichinen
Rechter "	0,36 "	
Linker "	0,21 "	{ vereinzelte " spärliche "
Rechter "	0,63 "	

Andere Tiere dieser Serie ergaben ähnliche Resultate, so daß wir uns die Wiedergabe der Protokolle ersparen können. Betont sei, daß die Meerschweinchen der zweiten Serie, die nur einmal und überdies mit geringen Mengen trichinigen Fleisches gefüttert worden waren, eine weit schwächere muskuläre Allgemeininfektion zeigten wie jene der ersten Serie, so daß die Bedingungen für eine Bevorzugung der nicht gelähmten Muskeln auch in dieser Beziehung besonders günstig lagen, da sich bekanntlich bei hohen Graden der trichinigen Infektion auch im sonst normalen Wirte die Besiedelungsdifferenzen verschiedener Muskeln zum Teile verwischen.

Ferner haben wir bei der Abschätzung des Invasionszustandes nur die Befunde von ausgewachsenen bzw. von bereits eingekapselten Würmern verwertet. In den gelähmten und atrophischen Muskeln fanden sich aber an manchen Stellen histologische Veränderungen (Quellung und Kernproliferation der Muskelfasern, Herde von Leukozyten usw.), welche dafür sprachen, daß hier wohl eine Einwanderung von Trichinen erfolgt war, daß aber keine ungestörte Fortentwicklung der Parasiten zustande kam, sondern daß die Trichinen an diesen Stellen abstarben (vermutlich nach einer transitorischen Wachstumsperiode) und resorbiert wurden. Sicher geraten die ausgewanderten Trichinellen im stark atrophischen Muskel unter ungünstige Ernährungsbedingungen; denn sie waren im Vergleich zu der nichtgelähmten Seite im Wachstum zurückgeblieben, und selbst die enzystierten Exemplare wiesen vielfach geringere Dimensionen auf.

Auf Grund der hier mitgeteilten Experimente ergeben sich nachstehende Schlußfolgerungen:

1) Auch in völlig gelähmte und bereits hochgradig atrophische Muskeln können Trichinellen einwandern und daselbst ihre Entwicklung bis zum enzystierten Stadium beenden; dies gilt auch für Muskeln, die schon im normalen Zustande schwächer von Trichinen befallen werden als andere (Muskeln der

hinteren Extremität). — 2) Die Invasion in gelähmte und atrophierende Muskeln kann unter Umständen einen beträchtlichen Umfang erreichen (Meerschweinchen J 3). — 3) Nicht immer läßt sich ein deutlicher Unterschied der Besiedelungsdichte gelähmter und kontralateraler nicht gelähmter Muskeln feststellen. Ist jedoch eine solche Differenz nachweisbar, so sind die gelähmten Muskeln stets schwächer infiziert als die normalen¹⁾. — 4) Die Muskelatrophie verschlechtert die Ernährungsbedingungen der eingewanderten Trichinellen. — 5) Die Versuche sprechen gegen die Ansicht, daß die Trichinelleninvasion in quantitativer Hinsicht der Arbeitsleistung der befallenen Muskeln proportional ist.

Nachdruck verboten.

Vergleichende Untersuchungen über das Reduktionsvermögen der anaeroben und aeroben Bakterien.

[Aus dem Statens Seruminstitut, Kopenhagen, C. Direktor Dr. Th. Madsen.]

Von G. C. Reymann.

Mit 4 Abbildungen im Text.

Die Bakterien üben bekanntlich alle Reduktionswirkungen aus, was eine natürliche Folge der Dissimilation ist, die wegen des Sauerstoffverbrauches sich als eine Reduktion einiger Substratbestandteile äußern muß, und zwar selbst bei solchen Bakterien, die wie die Nitrat- und Nitritbakterien und andere, zugleich spezielle Oxydationswirkungen ausüben; Auch wurde seinerseits von Wichern für die Typhus-Coligruppe gefunden, daß Wachstums- und Reduktionskurven völlig kongruent sind.

Die Reduktionswirkungen werden bekanntlich in prägnanter Weise mittels Farbenreaktionen gezeigt, und für die folgenden Untersuchungen wird hauptsächlich Methylenblau verwendet, dessen Reduktion zur Leukoverbindung in dieser Verbindung den Vorteil hat, daß sie durch Wasserstoffanlagerung erfolgt. Aus demselben Grund sind hier ebenfalls Neutralrot und Thionin verwendbar.

Die Fragen, auf welche hier näher eingegangen wird, beziehen sich hauptsächlich auf einen Vergleich zwischen dem Reduktionsvermögen der Aë- und Anaeroben und auf die Temperatur- und Sauerstoffempfindlichkeit von deren reduzierenden Stoffen.

Gewöhnlich wird angenommen, daß bei den 3 großen Bakteriengruppen, den obligaten Anaeroben, fakultativen und obligaten Aëroben die Reduktionsfähigkeit in der genannten Reihenfolge abnimmt, obwohl auch zerstreut Angaben über schwache Reduktion seitens obligater Anaeroben sich finden, z. B. bei Omelianski (Rauschbrandbazillus). Indes darf man anzunehmen wagen, daß die Annahme betreffs der stärkeren Reduktionsfähigkeit der Anaeroben einigermaßen von dem Umstande beeinflusst wird, daß sie darauf angewiesen sind, in ausgedehntem Grade ihren Sauerstoffbedarf durch Reduktion der Substratbestandteile zu decken, was aber keine besonders starke Reduktionsfähigkeit, sondern nur eine spezifische Richtung dieser zu involvieren braucht. Jedenfalls konnte in meinen Untersuchungen durchgängig keine stärkere Reduktion dieser Organismen, als der fakultativen, mit welchen gearbeitet

1) Es wurde kein Fall beobachtet, wo der gelähmte Muskel vollkommen frei von Trichinen war, hingegen im nichtgelähmten Muskel Trichinen nachgewiesen werden konnten.

wurde, nachgewiesen werden, wohl aber in einigen Fällen sogar eine weit geringere.

Auf eine nähere Besprechung der allmählich groß gewordenen Literatur über Bakterienreduktion wird hier nicht eingegangen, ich verweise daher in dieser Beziehung auf die Arbeit von Wichern und auf das Handbuch von Kruse. Speziell betreffs der Anaërobenreduktion wurden von Cahen, Th. Schmith, A. Wolf und Fr. Müller orientierende Untersuchungen angestellt.

1922 wurde die Frage von Mc Leod und Gordon aufgenommen, und zwar mit dem Resultate, daß die Anaëroben eine stärkere Nitroprussidreduktion als die Aëroben in der Kultur geben. Ihre Beweisführung bildet ein ganzes System mit den Ausgangspunkt, daß die Reduktion der Bakterien in einer Peroxydbildung (Wielsands Gleichung: $O : O + 2 H \rightarrow H . O . O . H + 2 H = 2 H_2O$) Ausschlag gibt, doch kann man das Reduktionsvermögen nicht direkt nach der Peroxydbildung schätzen, weil diese weiter durch die Peroxydempfindlichkeit und die Fähigkeit zur Katalasebildung der betreffenden Bakterie begrenzt wird. Die Anaëroben sind angeblich keine ausgiebigen Peroxydproduzenten, weil sie diesem Stoffe gegenüber sehr empfindliche sind und sehr wenig Katalase produzieren; Ihre Peroxyd-Produktion ist weiter so klein, daß sie sich nur indirekt durch schichtenweise Grünfärbung von Hämoglobinagar nachweisen läßt (eine Reaktion, die von Callow nicht bestätigt werden konnte). Die starke Nitroprussidreduktion wird nach den zitierten Forschern einer Reduktion des Glutathion Hopkins alias des Philothion von Rey-Pailhade zugeschrieben.

Bezüglich der Natur der Reduktion darf wohl als allgemeine Annahme bezeichnet werden, daß wir es hier mit schwachen Fermenten (Reduktasen) zu tun haben. Für die Richtigkeit dieser Auffassung spricht ihre enge Anknüpfung an die Lebenstätigkeit sowie der pH -Bereich ihrer Wirksamkeit (optimale Wirkung um den Neutralpunkt und ihre starke Abschwächung bei höheren Temperaturen). Daß wir es aber jedenfalls bei den Anaëroben und mitunter bei den Aëroben nicht mit Fermenten allein zu tun haben, zeigt die von Mc Leod und Gordon gefundene Koktostabilität der Nitroprussid reduzierenden Stoffe und die hier nachgewiesene Koktostabilität der Methylenblau reduzierenden Stoffe dieser Bakterien. Ferner zeigt der später zu erwähnende Umstand, daß der Reduktionstiter der zweitätigen kräftigen Kultur immer fast dieselbe Größe hat, daß es sich um schwach wirkende Fermente handelt, die im Gegensatz zu vielen anderen Fermenten wohl eben in den für das Gedeihen der Bakterien notwendigen Mengen gebildet werden. Die später zu zeigende verhältnismäßig geringe Abschwächung der Reduktionsstoffe der Anaëroben durch Wärme deutet an, daß diese Bakteriengruppe sich durchgängig durch eine weniger ausgiebige Bildung von eigentlichen Reduktasen auszeichne. Hier hat man wahrscheinlich eine Mischung von Glutation und Fermenten vor sich.

Betreffs der Technik zeigten dann Versuche mit in physiolog. Kochsalzlösung aufgeschwemmten Agarabschabungen, daß bei den Anaëroben diese Anordnung unverwendbar war, während die anderen Bakterien auch hier starke Reduktionsphänomene zeigten. Eine bessere Vergleichsgrundlage gaben anaërob gewachsene Bouillonkulturen¹⁾ ab, welche im Apparate von McIntosh und Fieldes gezüchtet worden waren, und weiter gewöhnliche Kulturen unter hohem Paraffinoelschicht. Während hier die Aëroben und die Fakultativen ohne Schädigung der Reduktionsfähigkeit zu gleicher Dichte verdünnt werden

1) Die Bouillon war gewöhnliche Pferdefleischbouillon (1 Liter Wasser pro 0,5 kg Fleisch) mit 1,0 Proz. Pepton Witte, Autoklavieren 10 Min. bei 125°. Schluß-pH 7,0—7,2. Kalbfleischbouillon ist ebenso verwendbar. Bei Agarkulturen wurde 2,5 Proz. Agar verwendet.

konnten, erfuhr sie bei den Anaëroben eine beträchtliche Abnahme. Es mußte daher zum Vergleich verschiedener Kulturen hauptsächlich solche verwendet werden, die bis zu derselben Dichte gewachsen waren. Dagegen schien mir die von Catcart und Hahn verwendete Methode mit in Bouillon aufgeschwemmten abgewogenen Bakterienmengen (Agarabschabungen) weniger verwendbar, weil die Bakterien hier aus ihrem natürlichen Milieu entfernt werden.

Die Versuche wurden in engen Reagenzgläsern mit abpipettierten Kulturdosen und unter Paraffinschicht vorgenommen. Gewöhnlich wurden zu 2 ccm Kultur 2 ccm Methylenblaulösung (Inhalt: 0,1 mgr M.blau) verwendet und diese Farbstofflösung wurde natürlich unmittelbar vor dem Versuche ausgekocht. Der Reduktionsversuch fand bei 40° im Wasserbad statt. Die Reoxydation an der Berührungsfläche zwischen Paraffin und Kultur-Farbstoffmischung während des Versuches wurde unberücksichtigt gelassen, die Wasserstoffionenkonzentration war immer um pH 7, nie aber niedriger als 6 oder höher als 8. Innerhalb dieser Grenzen konnten in besonderen Reaktionsgeschwindigkeitsversuchen nur unbeträchtliche Unterschiede festgestellt werden.

Da vermutet werden dürfte, daß die oben erwähnten Schwierigkeiten bei der Herstellung von Verdünnungen aus Anaërobenkulturen von einer Sauerstoffempfindlichkeit der reduzierenden Stoffe dieser Bakterien herrühre, wurden Versuche hierüber angestellt.

Diese Sauerstoffwirkung gegenüber den Anaëroben kann entweder primär oder sekundär sein, d. h. von im Substrate absorbiertem Sauerstoff, beziehungsweise von sauerstoffreichen Stoffwechselprodukten (z. B. Peroxyden) herrühren. In Ihren Theorien über die Einwirkung des Sauerstoffes auf die Anaëroben lassen sowohl McLeod und Gordon als v. Oettingen die primäre Wirkung unberücksichtigt; die ersteren beschäftigen sich mit ihr nur insofern, als sie fanden, daß die Peroxybildung, welche unter gewissen Verhältnissen im unbeimpften Substrate stattfinden kann, wachstumshemmend wirkt. Beide sind der Meinung, daß Hauptgewicht wäre auf die von den Anaëroben gebildeten Stoffwechselprodukte zu legen, d. h. nach McLeod und Gordon: Peroxyd-bildung in Verbindung mit versagender Katalasebildung, nach v. Oettingen: fehlende Fähigkeit, den in Freiheit gesetzten Sauerstoff ihren sauerstoffarmen Stoffwechselprodukten zu adjungieren. Es wird mit anderen Worten das Hauptgewicht auf die Sauerstoffautointoxikation gelegt. Die Beweise für die Peroxyd-bildung sind indessen, wie oben erwähnt, als schwach zu bezeichnen.

Die Annahme dieser Autointoxikation als wachstumsverhindernden Faktor scheint mir etwas gezwungen, und höchstens als wachstumsbegrenzenden Faktor in Betracht zu kommen, ebenso wie auch alle andere Bakterien zu einem gewissen Zeitpunkte ihr Wachstum zum Teil wegen einer Anhäufung von Stoffwechselprodukten sistieren, denn es ist ja gerade für die Anaëroben charakteristisch, daß, wenn Wachstum erst eingetreten ist, sein Verlauf immer glatt ist; sie können zu diesem Zeitpunkte gegenüber der Giftwirkung des Sauerstoffes so unempfindlich sein, daß, wie z. B. von Ramon berichtet wird, man durch Tetanuskulturen täglich große Mengen von reinem Sauerstoff leiten kann, wenn das Wachstum erst in gutem Gange ist, d. h. 48 Stunden nach dem Beimpfen, und zwar ohne der Toxinbildung zu schaden, was jedenfalls nicht mit der Theorie von v. Oettingen übereinstimmt.

Aber auch nicht gegenüber im Nährboden vor dem Beimpfen absorbiertem Sauerstoff, d. h. gegenüber der primären Sauerstoffwirkung, sind die Anaëroben völlig wehrlos: Ich unternahm einige Experimente mit dem *Bacillus Tetani*, wo der Agar gleich vor dem Beimpfen, und etwa bei seiner Erstarrungstemperatur, mit atmosphärischer Luft andauernd geschüttelt wurde. In diesem Agar war während des Wachstums die Luftentwicklung bedeutend stärker als

in Kontrollkulturen, wo der Agar sorgfältig ausgekocht und somit luftfrei war.

Die Luftentwicklung der Anaëroben ist somit sicher von reduktiver Bedeutung, obwohl ich über die Reduktionsweise keine bestimmten Angaben machen darf. Versuche, die zu dem Zweck angestellt wurden, im Reduktionsversuche selbst die Reduktionsfähigkeit der ausgeschiedenen luftförmigen Verbindungen durch Probieren der Kulturen vor und nach Aussaugen bei 4 mm Druck nachzuweisen, gaben keine eindeutigen Resultate, da die ausgesaugten Kulturen bald stärker, bald schwächer reduzierten. Man muß somit hier wohl auch eine Wirkung in st. nasc. dieser Verbindungen in Betracht ziehen, was zugleich involviert, daß die Reduktion dieser Bakterien in dem Medium selbst, wo sie gewachsen sind, untersucht werden muß. Die untenstehende Tabelle gibt über diese Versuche weitere Aufschlüsse:

Tabelle I.

Zweitägige Bouillonkulturen (37°) unter Paraffinoel. Die untenstehenden Kultur-
mengen (ccm) gaben in derselben Zeit bei 40° gleich starke Reduktion von Methylenblau.
Vor und nach Aussaugen (1/2 Std. bei 4 mm Druck),

<i>B. parasporogenes</i>	0,33	0,25
<i>B. botulinus</i>	0,25	0,20
<i>B. histolyticus</i>	0,75	1,5
<i>Clostridium pasteurian.</i>	0,9	0,5
<i>B. welchii</i>	1,0	1,2
<i>B. multifementans</i>	keine Reduktion	
<i>B. bifermentans</i>	1,25	1,75
<i>B. aerofoetidus</i>	1,6	2,0
<i>B. suipestifer</i>	1,0	1,0
„ „	0,5	0,5

Da die Versuche mit den verschiedenen Bakterienarten an verschiedenen Tagen und mit Kulturen von verschiedener Dichte unternommen worden sind, sind sie nicht untereinander vergleichbar. Die Tabelle zeigt nur, daß ein Aussaugen der Kultur bei Anaëroben im Gegensatz zu der fakultativ anaëroben Kontrolle die Reduktionsintensität ändert.

Da die Anaëroben, wie oben erwähnt, durch eine vermehrte Produktion von reduzierenden Stoffen sich gegen den Sauerstoff wehren, mußte die früher besprochene, vermeintliche besondere Sauerstoffempfindlichkeit ihrer reduzierenden Stoffe bei sistiertem Wachstum untersucht werden. Für diesen Zweck eignet sich die Höhenschichtkultur.

Werden Reagenzgläser mit Bouillon-Peptonagar (pH 7 — 7,5) und einer passenden Methylenblaumenge (0.02 ccm einer molaren Lösung in 10 ccm Substrat) auf kochendem Wasserbad erhitzt, so wird der Farbstoff bekanntlich völlig entfärbt (reduziert). Nach Abkühlen werden die oberen Schichten allmählich reoxydiert, und zwar so weit die Luft von oben hineindringen kann. Die Geschwindigkeit dieses Prozesses ist von der Temperatur abhängig.

Reoxydierte Schicht in 18 Std.:

bei 37°	0,95	cm
„ 20°	1,2	„
„ 2°	1,5	„

Nach Beimpfen eines solchen Agars wird die Höhe dieser Schicht der Resultante der Reduktionskraft der betreffenden Bakterie und der Empfindlichkeit von deren reduzierendem Stoffe gegenüber Oxydation sein. Und nach Sistieren des Wachstums, z. B. bei 0°, wenn durch genügend lange Observationszeit eventuelle Fehlerquellen, wie Diffusionsgeschwindigkeit und Reduktionsstärke der gebildeten Stoffe ausgeglichen worden sind, läßt in dieser Weise einfach die Sauerstoffempfindlichkeit dieser Stoffe sich messen. Die nachstehenden

Fig. I und II zeigen Beispiele solcher Versuche, die mit einer langen Reihe von Anaëroben vorgenommen worden sind. (Fig. 1 u. 2.)

Die Einzelheiten der Versuche waren: Die mit den Bakterien beimpften Agargläser wurden bei 37° im Apparate von McIntosh und Fieldes und (Fig. II) auch aërob gezüchtet, und man sieht, daß der Farbstoff im ersteren Falle durch die ganze Agarsäule reduziert wird. Nach 2tägigem Wachstum wurden die Kulturen in den Kühlraum bei 0° gestellt und die Höhe der reoxydierten Schicht täglich gemessen.

Bei einer Reihe solcher Experimente stellte es sich heraus, daß die reduzierenden Stoffe der obligaten Anaëroben sauerstoffempfindlicher als die der fakultativen waren, und es ging weiter dabei hervor, daß ein weniger strenger Anaërober, wie *B. Tetani* in dieser Beziehung eine Mittelstellung einnimmt; eine ähnliche Stellung nimmt der *B. botulinus* ein. Ob im allgemeinen die in dieser Weise beobachtete Sauerstoffempfindlichkeit mit der Sauerstofftoleranz der verschiedenen Anaëroben parallel verläuft muß bis auf weiteres dahingestellt bleiben, wenn hier eine einfache Methode zur Feststellung der relativen Anaërobie verschiedener Bakterien vorhanden ist.

Die Versuche ergaben mit Thionin und Indigokarmin dieselben Resultate, und

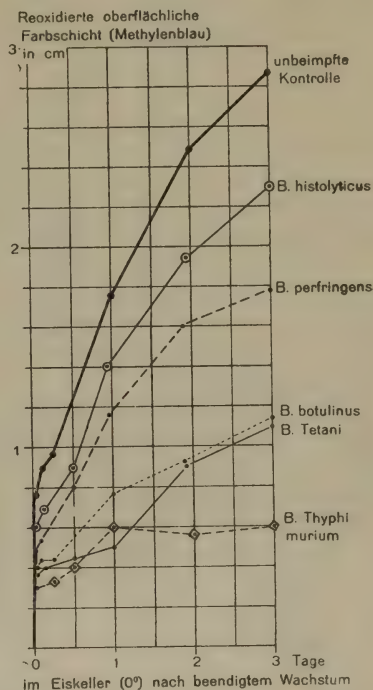


Fig. 1.

Höhenschichtkulturen anaërob.

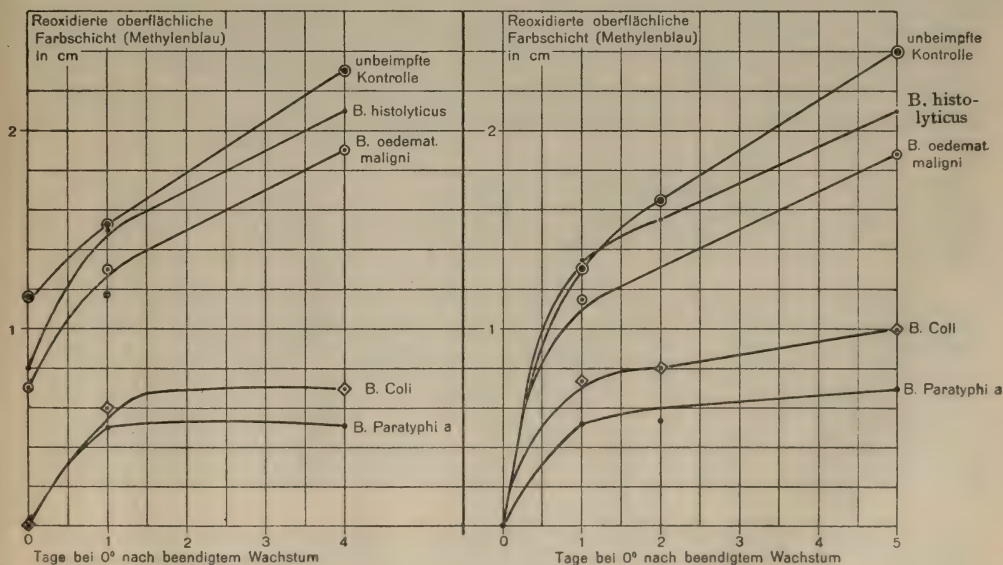


Fig. 2.

Höhenschichtkulturen aërob.

Höhenschichtkulturen anaërob.

man konnte weiter durch Parallelversuche mit aërober Züchtung in Höhenschicht und nachherigem Hinstellen bei 0° konstatieren, daß die reduzierenden Stoffe der fakultativen Bakterien hier weniger sauerstoffempfindlich als nach anaërober Züchtung waren (Fig. II). Weiter stellte sich heraus, daß gleich wie im Blindversuche das Eindringen des Sauerstoffes bei höheren Temperaturen langsamer vor sich geht.

Die größere Sauerstoffempfindlichkeit der reduzierenden Stoffe der Anaëroben kann als eine nähere Einengung der Frage über die primäre Giftwirkung des Sauerstoffes angesehen werden, und trägt zum Verständnis der größeren Schwierigkeiten bei den Anaëroben bei, denn eine Bildung reduzierender Stoffe ist für den Anfang des Wachstums eine Notwendigkeit.

Wie bei der Besprechung der Technik erwähnt wurde, steht die Reduktionsfähigkeit der Anaërobenkulturen Farbstoffen gegenüber nicht immer in direktem Verhältnis zur Dichte der Kultur, ebenso wie die Reduktionsfähigkeit dieser Kulturen durch Verdünnen eine Abschwächung erfährt, die größer als der Verdünnungsgrad ist.

Es war deshalb schwierig, eine Vergleichsgrundlage verschiedener Kulturen zu finden, doch konnte festgestellt werden, daß die Anaëroben im allgemeinen langsamer als die Fakultativen reduzieren, und zwar sowohl bei Kulturen von derselben Dichte, als wenn die ersteren zu größerer Dichte als die letzteren gewachsen sind. Ausnahmen waren selten.

Diese Unregelmäßigkeiten stehen vielleicht mit der Art dieser Stoffe bei diesen Gruppen in Verbindung: während somit bei *Coli* und *Paratyphus* durch die mehr oder weniger vollständige Abzentrifugierung der Bakterien die Reduktionsfähigkeit immer beträchtlich herabgesetzt wurde, war bei *B. botulinus* und *B. sporogenes* dies nicht immer der Fall; ebenso wie *B. botulinus*-Kulturen auch Reduktionsstoffe enthalten konnten, die Berkefeldtfilterpassieren konnten.

Da die Mehrzahl der Versuche mit Paraffinoelkulturen vorgenommen wurde, konnte man den Einwand machen, daß die Anaëroben hier unter halbanaëroben Verhältnissen gezüchtet worden seien. Es wurde aber durch einen Vergleich mit unter anaëroben Verhältnissen gezüchteten Kulturen gezeigt, daß *Coli* und *Paratyphus*, trotzdem sie hier eine geringere Wachstumsintensität als unter halbanaëroben oder aëroben Verhältnissen zeigten, doch mit den am schnellsten reduzierenden der 15 untersuchten Anaërobenarten gleich waren:

<i>B. coli</i> , totale Redukt. in 8 Min.	
<i>B. paratyphi</i>	2 „
<i>B. welchii</i>	5 „
Die übrigen Anaëroben reduzierten in 11—90 Min.	

Die reduzierenden Stoffe der Fakultativen zeigen, wie oben erwähnt, nach anaërober Züchtung eine größere Sauerstoffempfindlichkeit, was auch für die obligaten Anaëroben gilt, weshalb die quantitative Untersuchung ihrer reduzierenden Stoffe bei halbanaërober Züchtung erleichtert wird. Als Beispiel wird die untenstehende Figur III angeführt, wo absteigende Kulturmengen in Reihen von Reagenzgläsern abgemessen wurden, diese mit derselben Methylblau besetzt und mit Vaseline übergossen und in Wasserbad bei 40° gestellt wurden. (Fig. 3, S. 407.)

Diese Figur zeigt, daß die Verschiebungen im Reduktionstiter nach 4stdig. Hinstellen nur gering sind, und weiter, daß der Unterschied zwischen *B. sporogenes* und den beiden Fakultativen nur klein ist, während *B. subtilis* und *B. tetani* eine weit geringere Reduktionsfähigkeit aufweisen.

Unten werden 2 weitere Versuche angeführt, wo die 1. Kolonne ein Maß für die Dichte der Kultur in der Weise gibt, daß die Zahlen die zu derselben Menge der respektiven Kulturen zu setzende Anzahl cem NaClLösung angibt, welche notwendig ist, um die gleiche Dichte zu erreichen, während die 2. Kolonne die geringsten in derselben Zeit reduzierenden Kulturmengen angibt.

Versuch a)	<i>B. parasporogenes</i>	3,25	0,2
	<i>B. coli</i>	2,85	0,25
	<i>B. parat. a</i>	1,85	0,325
	<i>B. sphenoides</i>	1,5	0,45
	<i>Clostridium pasteur.</i>	1,0	0,465

Versuch b)	<i>B. aerofœtidus</i>	2,0	0,8
	<i>B. coli</i>	1,75	0,3
	<i>B. suipestifer</i>	1,5	0,4
	<i>B. sporogenes</i>	1,25	0,7
	<i>B. botulinus</i>	1,1	0,4
	<i>B. parat. a</i>	1,0	0,3

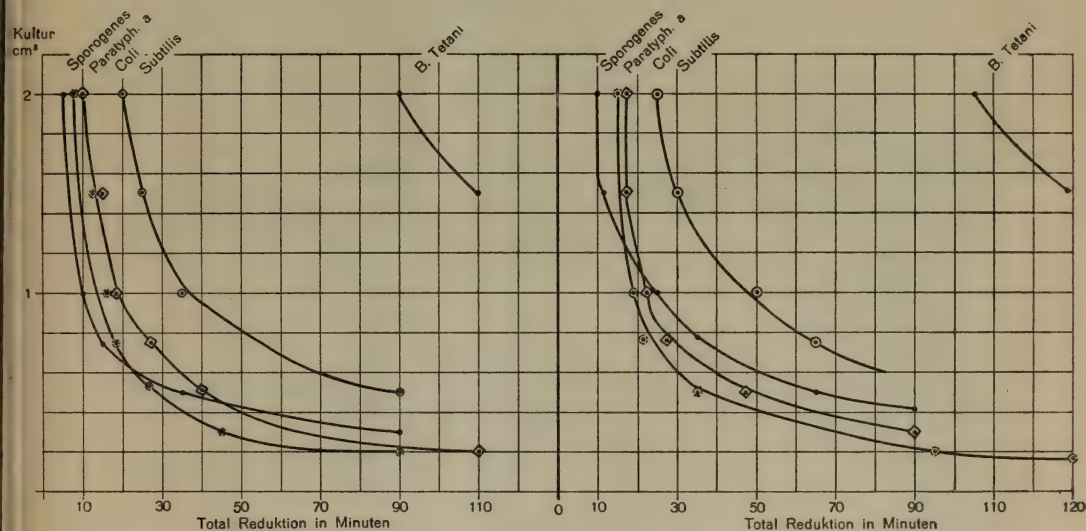


Fig. 3.

Kulturen von gleicher Dichte.

10 Uhr vormittags.

2 Uhr nachmittags.

Aus dieser Tabelle geht hervor, daß während im ersteren Versuche (a) die Reduktionsfähigkeit der Kulturen Methylenblau gegenüber etwa im direkten Verhältnis zu ihrer Dichte steht, im letzteren (b) dagegen die Anaëroben eine relativ geringere Reduktionsfähigkeit aufweisen.

Die angeführten Beispiele, die noch durch mehrere ergänzt werden konnten, zeigen mit hinlänglicher Deutlichkeit, daß unter diesen Verhältnissen gegenüber dem Methylenblau von keiner stärkeren Reduktion seitens der Anaëroben gesprochen werden kann. Man findet aber Anaëroben von stärkerer und geringerer Reduktionskraft, ja sogar solche, die, wie *B. multifementans* und *B. bifementans*, das Methylenblau gar nicht oder nur äußerst schwach und selten reduzieren.

Reduktionsfähigkeit vor und nach Erwärmen der Kulturen.

Es wurde von McLeod und Gordon gefunden, daß die Anaëroben im Gegensatz zu den Aëroben Stoffe bilden, welche selbst nach Kochen eine starke

Reduktion Natriumnitroprussid gegenüber ausüben. Für die Versuche verwendeten sie Nährböden, die aus Fleischextrakt zubereitet worden waren. Indes konnte ich in den von mir aus Pferde- und Kalbsfleischbouillon hergestellten Nährböden nicht mit derselben Konstanz diese Stoffe nachweisen.

Dagegen habe ich gefunden, daß betreffs der Methylenblaureduktion in meinen Nährböden derselbe Unterschied zwischen Aë- und Anaëroben zu finden war, obwohl einzelne Anaëroben in Bezug auf Koktostabilität ihrer Reduktionsstoffe versagten.

Dieses Verhältnis wurde, soviel ich weiß, quantitativ nicht früher untersucht.

Betrachten wir zuerst die Verhältnisse in anaërob gewachsenen Kulturen. Untenstehende Tabelle zeigt eine Reihe von solchen vor und nach viertelstündigem Erwärmen auf 100° C.

Tabelle III.

4 tägige anaërobe Kulturen bei 37°.

		Totale Reduktion nach den untenangegebenen Zeiten in 2 cm ³ Kultur + 1 cm ³ Methylen- blaulösung (0,05 mgr. M.).	
		Vor Erwärmen	Nach viertelstd. Erwärmen 100°
B. bifermentans		18 Min.	65 Min.
B. perfringens	} Synonyme	11 "	80 "
B. welchii		5 "	80 "
Vibrio septique	} Synonyme	7 "	155 "
B. oedemat. malign.		60 "	125 "
Clostridium pasteur.		17 "	in 3 Std. keine Reduktion
B. botulinus		17 "	32 Min.
B. histolyticus		16 "	35 "
B. parasporgenes		13 "	45 "
B. tetanomorpheus		40 "	65 "
B. Tetani		22 "	17 "
B. aërofoetidus		20 "	32 "
B. multifementans		90 "	in 3 Std. keine Reduktion
B. oedematiens		65 "	120 Min.
B. sphenoides		90 "	110 "
B. coli		8,5 "	in 3 Std. keine Reduktion
B. paratyph. a		2 "	60 Min.

Aus obiger Tabelle geht hervor, daß mit Ausnahme des Clostr. past. und des B. multifementans die reduzierenden Stoffe der Anaëroben beim Erwärmen nicht destruiert, sondern nur beträchtlich abgeschwächt werden, oder vielmehr die fermentartigen Stoffe destruiert werden. In dieser Beziehung spielt es wahrscheinlich eine Rolle, daß diese Bakterien besonders stark luft-entwickelnd sind. Der B. tetani bildet hier im Vergleich mit anderen Versuchen auch insofern eine Ausnahme, als die Reduktion nach Erwärmen stärker als vor demselben ist. Von den beiden Fakultativen (Coli und paratyph.) werden die reduzierenden Stoffe des ersteren total vernichtet, während sie beim letzteren bedeutend abgeschwächt werden, was unter normalen Wachstumsbedingungen nicht immer stattfindet. Ich habe aber mehrmals bei diesem Bakterium eine größere Neigung zur Bildung von koktostabilen Reduktionsstoffen beobachtet, wenn anaërob gezüchtet wurde. Ob dieser Unterschied zwischen Coli und paratyphi als diagnostisches Merkmal sich verwenden läßt, muß bis auf weiteres dahin gestellt bleiben.

Man sieht somit, daß obwohl die weit überwiegende Mehrzahl der untersuchten Anaëroben reduzierende Stoffe ausscheiden, die zum Teil koktostabil sind, dies unter den untersuchten Verhältnissen als kein Charakteristicum bei Anaëroben angesehen werden darf, so wie es auch mit Bezug auf die Nitroprussid reduzierenden Stoffe von McLeod und Gordon angegeben worden ist.

Wir sehen andererseits, daß ihre Abwesenheit unter anaëroben Verhältnissen für die Fakultativen nicht absolut charakteristisch ist.

Da die Anaëroben auch unter halbanaëroben Verhältnissen, d. h. bei Züchtung unter Paraffinoelschicht, koktostabile Reduktionsstoffe bilden, wurde unter diesen Verhältnissen ein Vergleich mit den Aëroben unternommen, wo die Entwicklungsmöglichkeiten für beide gleichartiger sind, oder wo sie, so zu sagen, auf halbem Wege sich begegnen. Untersucht man hier die abschwächende Einwirkung verschiedener höherer Temperaturen, so wird das an der untenstehenden Kurve geschilderte Verhalten hervorgehen (Fig. 4). Die Ordinaten geben hier die Anzahl der Reduktionseinheiten pro cem Kultur an, d. h. die reziproken Werte der Zeit, in welcher dieselbe Menge der Kultur dasselbe Quantum einer Methylenblaulösung von gleicher Konzentration reduziert. Die Abszisse zeigt die Erwärmungstemperaturen. (Fig. 4.)

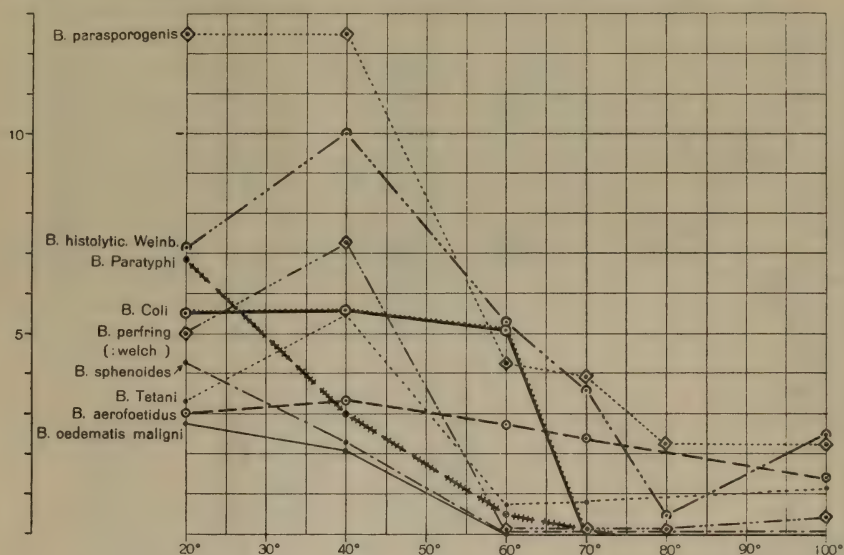


Fig. 4.

Die entnommenen Kulturproben wurden 1 Std. auf 20 — 40 — 60° gehalten oder auf 100°, aber nur eine Viertelstd., während der Reduktionsversuch selbst bei 40° ausgeführt wurde. Es geht daraus hervor, daß die reduzierenden Stoffe sämtlicher Bakterien bei höheren Temperaturen eine beträchtliche Abschwächung erfahren, und daß die der beiden Fakultativen bei 70° vollständig vernichtet wurden. Nur bei 2 Anaëroben, u. z. *sphenoides* und *B. oedem. mal.* war letzteres fast der Fall. Ich habe aber andere Kulturen dieser Bakterien gehabt, wo unter halbanaëroben Verhältnissen eine größere Koktostabilität vorhanden war.

Zusammenfassend, kann gesagt werden, daß mit einzelnen Ausnahmen diese koktostabilen Stoffe ebensogut bei halb anaëroben, wie unter streng anaëroben Verhältnissen gebildet werden, sodaß auch Kulturen der ersteren Art für Reaktionsgeschwindigkeitsversuche verwendbar waren. Auf diese werde ich hier nicht näher eingehen, sie zeigten aber, daß auch die Reaktionsgeschwindigkeit bei den Reduktionsprozessen der Anaëroben durchgängig geringer ist.

Da nun die gegenüber Methylenblau gemessenen reduzierenden Stoffe der An- und Aëroben nicht absolut qualitative, sondern nur quantitative Unter-

schiede aufweisen, wäre es angezeigt zu untersuchen, ob sie quantitativ durchgehend so große Unterschiede darbieten, daß man in dieser Beziehung eine Trennung der Gruppen vornehmen kann, und zwar durch Aufstellen eines Reduktionsquotienten, der so berechnet wurde, daß die Anzahl von Reduktionseinheiten pr. cm³ Kultur nach $\frac{1}{4}$ stündig. Kochen durch die vor dem Kochen gefundene Anzahl dividiert wurde. Untenstehende Tabelle zeigt diesen Quotient bei einer Reihe von Kulturen verschiedenen Alters. Es finden sich in ihr sowohl in Wasserstoffatmosphäre als unter Paraffinöl gezüchtete Anaëroben und schließlich einige obligate Aëroben.

Tabelle IV.

	1-		2-			4-			7-			10täg. Kulturen		
	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
Anaëroben														
B. aerofoetidus	0	.	0,33	0,4	.	0,66	0,86	.	0,44	0,91	.	1,91	.	.
„ sphenoides	.	.	0,28	0,0	.	0,82	.	.	0,61	.	.	1,82	.	.
„ parasporogenes	.	.	0,28	0,25	.	0,29	0,05	.	0,31	0,85	.	0,68	.	.
„ histolyticus	0	.	0,4	0,34	.	0,49	.	.	0,33	.	.	1,35	.	.
„ multifementans	0	.	0	0	.	0	.	.	0,003	.	.	1,48	.	.
„ perfringens	.	.	0,29	0,37	.	0,14	0,24	.	0,25	0,59	.	0,92	.	.
„ tertius	1,7	.	.
„ botulinus	0,0014	.	.	0,38	.	0,53	0,84	.	.	0,37	.	1,04	.	.
„ Tetani	0,38	.	.	0,35	.	1,28	.	.	.	3,5	.	1,0	1,0	.
„ tetanomorphus	0,62	.	.	.	0,3	.	0,71	0,59	.
„ oedematiens	0,49	.	.	2,0
„ bifermentans	0,28	1,0	.	.
Clostr. Pasteur.	.	.	.	0	.	0	0,8	.	.
Aeroben														
Strept. polychrom.	.	0	.	.	0	.	.	0,01	(0)	.	0,7	.	.	3,5
B. coli	.	0	.	.	0	.	.	0	0	.	0,24	.	.	0
„ vulgaris	.	0,01	.	.	0,03	.	.	0,01	0,05	.	0,04	.	.	0,028
„ brevis	.	0	.	.	0	.	.	0,02	0	.	0,19	.	.	0,14
„ typhi murium	.	0,01	.	.	0,01	.	.	0,001	0,006	.	0,03	.	.	0,05
„ paratyf. a	.	0	.	.	0	.	.	0	0,045	.	0,001	.	.	0,01
Spiril. Metschnik.	.	0	.	.	0	.	.	0	0,07
B. paratyf. b	.	0	.	.	0,05	.	.	0,03	0,003	.	0,08	.	.	0,2
„ suipestifer	.	0	.	.	0,01	.	.	0,015	0,02	.	0,08	.	.	0,2
„ anthracis	.	0	.	.	0	.	.	0	0
Diplococ. crassus	.	0	.	.	0	.	.	0	0
Staph. pyog. aur.	.	0	.	.	0	.	.	0	0
B. subtilis	.	0	.	.	0	.	.	0,1	(0)	.	0,5	.	.	2,5
Mikroc. tetrag.	.	0	.	.	0	.	.	0	0
Staphyloc. citreus	.	0	.	.	0	.	.	0	0	0
B. prodigiosus	.	0	.	.	0	.	.	0	0	.	0,03	.	.	0,04
„ Gärtner.	.	0	.	.	0	.	.	0,02	0,02	.	0,05	.	.	0,06
„ pyocyan.	.	0	.	.	0	.	.	0	0	.	0,36	.	.	0,5
„ Zopfii	.	0	.	.	0	.	.	0	(0)	.	0,3	.	.	0,01

a) bezeichnet Kulturen in Wasserstoffatmosphäre

c) bezeichnet gewöhnliche aërobe Kulturen

b) „ „ unter Paraffinöl

() „ schwaches Wachstum

Aus obenstehender Tabelle geht hervor, daß ein großer Reduktionsquotient nicht als für einen Anaëroben absolut charakteristisch angesehen werden kann, obwohl er für diese Bakterien unter gleichen Verhältnissen (z. B. gleichen Alters) in der Regel weit größer ist. Ferner darf man annehmen, daß unter den Methylenblau reduzierenden Stoffen in Nährböden, in denen die Bakterien gewachsen sind, welche koktostabile Reduktionsstoffe bilden, geringere Mengen von solchen fermentartigen Charakters als in den anderen Bakterienkulturen sich

finden, so daß man vielleicht die Anaërobiose 1. im Hinblick auf die früher erwähnten Oxydationsversuche als vom Vorhandensein sauerstoffempfindlicherer reduzierender Stoffe abhängig, und 2. von einer geringeren Bildung eigentlicher Reduktionsfermente (Reduktasen) bedingt definieren dürfte, und als Ersatz die Erwerbung der bekannten Fähigkeit zur Entnahme des Sauerstoffes den Substratbestandteilen hinzukommt, die Fähigkeit, worauf ihre Dissimilation basiert, oder, wie Orla Jensen es stärker ausdrückt: sie brauchen keine Atmungsenzyme, weil sie die nötige Energie durch Zuckerspaltung sich verschaffen.

Diese Auseinandersetzungen beanspruchen nicht, etwas prinzipiell Neues zu sein und keine neue Erklärung des immer rätselhaften Problems der Anaërobiose zu geben, sondern bezeichnen nur ein näheres Einkreisen der Frage und die Angabe eines Punktes, wo der Sauerstoff schädlich wirkt.

Daß auch einige der untersuchten obligaten Aëroben (*Subtilis* und *Streptococ. polychromaticus*) in allen Kulturen hohe Reduktionsquotienten aufweisen, steht mit dem Obenstehenden in keinem Widerspruche; denn das Verhalten alter Kulturen kann nicht als Ausdruck natürlicher Verhältnisse der betreffenden Bakterien dienen. In solchen Kulturen, wo die Bakterien ausgehungert sind, und wo sicher auch Sauerstoffmangel herrscht, werden sie zu einer kümmerlichen Lebensweise gezwungen. Man könnte sich dazu versucht fühlen, Parallelen zu ziehen zwischen dieser notgedrungenen Anaërobiose und der den Anaërobionten natürlichen; welche beide in einem hohen Quotienten Ausschlag geben, obwohl man natürlich nur mit Vorsicht aus den Verhältnissen einer auf 100° erhitzten Kultur solche weitgehenden Schlüsse ziehen darf. Auch die höheren Pflanzen werden ja bei Sauerstoffmangel zu intramolekularer Atmung gezwungen, wo ein stark reduktiver Abbau vor sich geht. Bei einer Betrachtung der jüngeren und jungen Kulturen werden wir aber mit vereinzelt Ausnahmen einen durchgreifenden Unterschied des Reduktionsquotienten beobachten und zwar bei den Anaëroben einen hohen Wert, bei den übrigen einen sehr niedrigen.

Zum Schlusse will ich kurz über einige, im Vorhergehenden nur berührte Verhältnisse berichten, welche die Art der besprochenen Stoffe andeuten. Diese Stoffe sind jedenfalls zum Teil von fermentartigem Charakter und an die Lebenstätigkeit der Zellen geknüpft, was schon daraus hervorgeht, daß sie die Farbstoffe nur bei Wasserstoffionenkonzentrationen reduzieren, die innerhalb des Wachstumsgebietes p_H ca. 5 — ca. 9 liegen und mit Optimum von p_H 7.

Ihre Konzentration ist gering. Für totale Reduktion der verwendeten geringen Methylenblaumengen (0,1 mgr.) war ca. 0,1 cm³ Bouillonkultur unter sämtlichen untersuchten Bouillonkulturen die geringste Dosis, die überhaupt zur Verwendung kam, es mußten in der Regel 0,25—1,0 cm³ verwendet werden.

Während es bei einzelnen Anaëroben gelang, die reduzierenden Stoffe teilweise zu berkefeldfiltrieren, ließ dies sich bei *Coli* und *paratyphi* nicht machen. Zentrifugierungsversuche gaben betreffs einer Abnahme des Reduktionsvermögens keine eindeutigen Resultate. Auch wurde konstatiert, daß die Nitroprussid reduzierenden Stoffe bei diesem Verfahren von den Methylenblau reduzierenden sich verschieden verhielten.

Daß die reduzierenden Stoffe auch extrazellulär wirken, geht aus der allgemeinen bekannten Beobachtung hervor, daß sie in festem Nährboden auch außerhalb der Kolonien wirksam sind.

Zusammenfassung.

Gewöhnlich wird angenommen, daß von den obligaten Anaëroben, fakultativen Anaëroben und obligaten Aëroben das Reduktionsvermögen von den ersten zu den letzteren zunimmt. Es wird indessen hier erwiesen, daß die mittleren am stärksten, die anderen gewöhnlich weniger stark reduzieren, und zwar betreffs der beiden ersten Kategorien sowohl bei anaërober als bei halbanaërober Züchtung (Paraffinöl). Für den Vergleich wurden Bouillon- und Bouillonagarnährböden, die nicht besonders kohlehydratreich sind, verwendet. — Das Obige war von vorneherein zu erwarten, weil das Reduktionsvermögen an die Dissimilationsvorgänge geknüpft ist und die Fakultativen mit dem größten Anpassungsvermögen ausgestattet sind.

Weiter wurde konstatiert, daß die reduzierenden Stoffe der obligaten Anaëroben gewöhnlich sauerstoffempfindlicher als die der fakultativen sind, was als eine nähere Einengung der Frage über die primäre Giftwirkung des Sauerstoffes für die Anaëroben zu bezeichnen ist. Als primäre Giftwirkung des Sauerstoffes wird die von im Nährboden vor dem Beimpfen gelöstem Sauerstoff ausgeübte bezeichnet, als sekundäre dagegen die von sauerstoffreichen Stoffwechselprodukten hervorgerufene. — Die Dichte der Kultur und ihr Reduktionsvermögen stehen bei den obligaten Anaëroben, im Gegensatz zu den fakultativen, nicht immer in direktem Verhältnis zu einander. — Die Methylenblau reduzierenden Stoffe der obligaten Anaëroben sind in höherem Maße als die der übrigen Bakterien koktostabil (100° in einer $\frac{1}{4}$ Std.), was durch einen Reduktionsquotienten angegeben wird. — Die obligaten Anaëroben besitzen durchgängig geringere Mengen von reduzierenden Fermenten als die Fakultativen.

Literatur.

Cahen, Fritz, Ztschr. f. Hyg. Bd. 2. 1887. S. 386. — Callow, A. B., Journ. of Pathol. and Bact. Vol. 26. 1923. S. 330. — Cathcart, E., und Hahn, M., Arch. f. Hyg. Bd. 44. 1902. S. 295. — Jensen, Orla., Oversigt over det kgl. Videnskab. Selsk.'s forhandl. 1906. — Kruse, Allgem. Mikrobiologie. 1910. S. 473 u. flg. — McLeod and Gordon. The biochemical Journ. Vol. 16. 1922; Journ. of Patholog. and Bakteriolog. Vol. 26. 1923. p. 127; Ibid. Vol. 28. 1925. S. 155. — Ibid. Vol. 28. S. 147. — The Biochem. Journ. Vol. 18. 1924. p. 931. — McIntosh, and Fildes, P., Lancet, 1916. I. p. 768. — Müller, Fr., Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 26. 1899. S. 51. — Oettingen, M. v. Ztschr. f. Hyg. Bd. 43. S. 463. — Omelianski, Lafars Hdb. d. techn. Mykol. Bd. 2. S. 587. — Schmith, Th. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 19. 1896. S. 181. — Wichern, H., Arch. f. Hyg. Bd. 72. 1910, S. 1. — Wolff, A., Centralbl. f. Bakt. Abt. 1. Orig. 1900. Bd. 27. — Wieland, H., Ber. d. Dtsch. chem. Ges. Bd. 2. 1914. Jhrg. 47.

Nachdruck verboten.

Der Einfluß der Ernährung auf die natürliche Resistenz.

[Aus der staatl. Kontrolle am Serotherapeutischen Institut Wien (Vorstand: Prof. B. Busson).]

Von **Yukitaka Hotta.**

Mit 6 Kurven im Text.

Die moderne Forschung hat längst erkannt, daß eine Infektionskrankheit nicht lediglich auf der Infektion durch das betreffende Bakterium beruht, daß vielmehr eine ganze Reihe anderer Faktoren für das Zustandekommen einer Erkrankung maßgebend ist. Diese können in bezug auf den Organismus innerer oder äußerer Art sein, wie beispielsweise Fehlen natürlicher Immunität und Resistenz, oder Hinzutreten schädigender äußerer Einflüsse, unter anderem Mangel oder Fehlen von für den Stoffwechsel notwendigen Substanzen in der Ernährung.

Gerade diesem letzterem Umstande wird nach unserer heutigen Auffassung eine wesentliche und wichtige Rolle für das Zustandekommen nicht nur gewisser Stoffwechselerkrankungen, sondern wohl auch von Infektionskrankheiten zuerkannt werden müssen.

Seit langem hat man den gegebenen Ernährungszustand des einer Erkrankung oder Infektion ausgesetzten Organismus bis zu einem gewissen Grade als mitbestimmend für den Ausbruch, den Verlauf und Ausgang der Erkrankung selbst angesehen, und die dahinzielende Forschung hat uns die Entdeckung der für den Haushalt des Organismus so außerordentlich wichtigen Ersatznahrungsstoffe, der Vitamine gebracht.

Ich habe schon vor längerer Zeit mit meinen Studien über den Einfluß des Vitaminmangels speziell bei Infektion auf Anraten meines verstorbenen Lehrers Fukuhara begonnen, und möchte nunmehr im folgenden über die Ergebnisse meiner Arbeiten, die ich nunmehr in Wien fortgesetzt und beendet habe, kurz berichten.

Was den Einfluß der Vitamine, respektive ihren Entzug auf die Widerstandskraft des Organismus speziell gegen Infektion betrifft, so möchte ich zunächst auf folgende Arbeiten verweisen:

Setti sah Tauben, die vitaminarm gefüttert waren, nach Infektion mit Erysipel oder Milzbranderreger auffallend rasch der Erkrankung erliegen und Findley konnte zeigen, daß Tauben, die gegen Pneumo- und Meningokokken sonst natürliche Immunität besaßen, diese verloren, wenn sie unter Ausschaltung vitamin B haltiger Nahrung gefüttert wurden. Ähnlich verlief das Experiment gegenüber der Infektion mit Coli- oder Gärtner-Bazillen. Zu gleichen Ergebnissen bei Tauben gelangten d'Asaro-Biondo in bezug auf Infektion mit Schweinerotlaufbazillen und ebenso Guerzini, wenn er Tauben mit Reis fütterte, der über eine Stunde im Autoklaven bei 150° gekocht worden war.

Nagahama fand, daß Meerschweinchen oder Ratten, die mit Rindfleisch als Hauptnahrung gefüttert waren, der Tuberkuloseinfektion resp. dem Fortschritt der Erkrankung größeren Widerstand entgegensetzen als solche Tiere, die ausschließlich mit ungeschältem Reis ernährt wurden. Auch nach Glogue und Page bewirkt die Ernährung der Ratte mit vitaminarmer Nahrung eine Empfänglichkeit für Tuberkulose. Weigert fütterte eine Gruppe junger Schweine mit Fettnahrung, die andere mit Kohlehydraten und infizierte dann beide Gruppen in gleicher Weise mit Tuberkelbazillen, worauf vorwiegend die mit Kohlehydraten gefütterten Tiere erkrankten.

Corde fütterte Tauben mit poliertem geschälten Reis unter Beimischung von Spargel und andererseits mit Spargel allein. Die erste Gruppe erwies sich gegen Infektion mit Rotlaufbazillen als immun, die zweite nicht.

Die Widerstandskraft der Meerschweinchen gegen Infektion mit Tuberkelbazillen wird nach Leichtentritt wesentlich erhöht, wenn man der Nahrung Zitronensaft beimengt. Auch

für den Menschen liegen Beobachtungen über eine wesentliche Beeinflussung des Organismus durch Darreichung oder Entzug bestimmter Vitamine vor. Niemann verzeichnete bei 12 mit Fett ernährten Säuglingen 3 Todesfälle an Influenza im Gegensatz zu 11 mit Kohlehydraten ernährten, von denen 9 an Influenza starben und auch Ritschel fand, daß fettarm ernährte Kinder allgemein weniger widerstandsfähig gegen Erkrankungen der Luftwege und Lungen sind als fettreich genährte. Auch die Empfänglichkeit der Haut für Staphylokokkenkrankungen in Form von Furunkulose ist nach Kleinschmidt bei fettarm genährten Säuglingen eine gesteigerte.

Es ließen sich noch zahlreiche andere Forschungsergebnisse über den Einfluß des Vitaminmangels bei Ernährung des Organismus, soweit dieser eine Auswirkung auf die Herabsetzung der Resistenz gegen Infektionskrankheiten bedingt, anführen, doch würde deren Aufzählung zu weit führen, um so mehr, als es auch Forscher gibt, die bei Nachprüfung der einen oder anderen experimentellen Ergebnisse zu gegenteiligen Schlußfolgerungen gelangten.

Dies gilt insbesondere für die Herabsetzung oder Erhöhung der Widerstandskraft gegen Tuberkuloseinfektion z. B. der Ratten oder Meerschweinchen. So konnte Lange für Ratten gegenüber Rindertuberkuloseinfektion kein geändertes Verhalten der einzelnen noch so verschieden gefütterten Gruppen untereinander gegen die Infektion feststellen und Bieling fand, daß z. B. bei Meerschweinchen, denen Vitamin C aus der Nahrung entzogen war, die Tuberkulose keinen wie immer geartet rascheren Verlauf nahm, als bei den Kontrolltieren.

Der Einfluß, respektive die Rolle, welche die Vitamine bei Stoffwechsel und Konstitutionserkrankungen spielen, ist ja viel besser erforscht und gekannt, als jene, welche sie in bezug auf die Erhöhung oder Herabsetzung der natürlichen Resistenz gegen Infektionen ausüben.

Und nur in dieser letzteren Richtung bewegen sich meine Versuche, über die ich im folgenden berichte.

Ich habe zu diesen meinen Versuchen ausschließlich weiße Mäuse benützt und dabei nach Möglichkeit gleichaltrige und gleich schwere Tiere ausgewählt. Es wurden stets Gruppen zu je 8 Mäusen unter genau gleichen Bedingungen gefüttert und durch entsprechende Haltung vor dem Einfluß äußerer Schädlichkeiten, wie Kälte oder Nässe geschützt.

Was zunächst die den Versuchstieren gereichte Nahrung betrifft, so war sie der jeweiligen Versuchsordnung entsprechend auch verschieden zusammengesetzt. Wasser stand den Versuchstieren stets in ausreichender Menge zur Verfügung.

Die von mir gewählte Versuchsordnung umfaßt verschiedene zusammengehörige Gruppen, die ich im folgenden wiedergebe:

I. Gruppe.

Versuche über den Einfluß der Fütterung mit qualitativ veränderter Nahrung.

1. Gewohnheitsnahrung.

Zur Kontrolle wurde einer Gruppe von Versuchstieren eine normale Gewohnheitsnahrung in Form von Hafer und Hausbrot gereicht. Wie bei den übrigen Versuchen wurde stets der Einfluß der Ernährung auf das Körpergewicht durch genaues Wägen der Tiere an jedem zweiten Tage festgestellt. Bei dieser Art der Fütterung trat fast durchwegs Gewichtszunahme auf (Kurventafel 1 N) und es konnte niemals, wie in anderen Versuchen, bei denen unvollkommene Nahrung gereicht wurde, Gewichtsverlust, Haarausfall, Abnahme des Haarglanzes usw. beobachtet werden. Deshalb bildet naturgemäß diese

Ernährungsform die Grundlage zum Vergleiche aller derjenigen Versuche, bei denen der Einfluß von geänderten Ernährungsbedingungen auf Körpergewicht und Widerstandskraft des Organismus gegen Infektion untersucht wurde.

2. Misch-Grund-Nahrung.

Zunächst versuchte ich die Fütterung mit einer von Hayashi angegebenen Mischgrundnahrung, die sich, wie folgt, zusammensetzt:

Pulver von geschältem Reis	83,4 g
Salzmischung (Chlornatrium 140,0, zitronensaures Kali 71,0, Milchsäures Kalzium 705,0, Biophosphatsäures Kali 253,0, schwefelsäures Kalzium 57,0) . . .	3,6 g
Oryzaninextrakt	1,0 g
Kasein	10,0 g
Lebertran	2,0 g

Bei dieser Fütterungsart sah ich aber im Vorversuche eine recht beträchtliche Abnahme des Körpergewichtes bei den Mäusen eintreten, woraus geschlossen werden dürfte, daß diese Zusammensetzung, die Hayashi zur Rattenfütterung verwendet hatte, für weiße Mäuse nicht in derselben Weise verwendbar sei. Ich ersetzte daher die Hayashische Salzmischung durch die von Collum¹⁾ angegebene Mischung und fügte noch 6 g Rettigsaft zu, um genügend reichlich Vitamin C darzuereichen, und mischte dafür um die gleiche Menge weniger Reispulver bei. Die Formel für diese Mischgrundnahrung lautet demnach:

1) Pulver von geschältem Reis	77,4
2) Kasein	10,0
3) Collumsche Salzmischung	3,6
4) Lebertran	2,0
5) Oryzaninextrakt	1,0
6) Rettigsaft	6,0

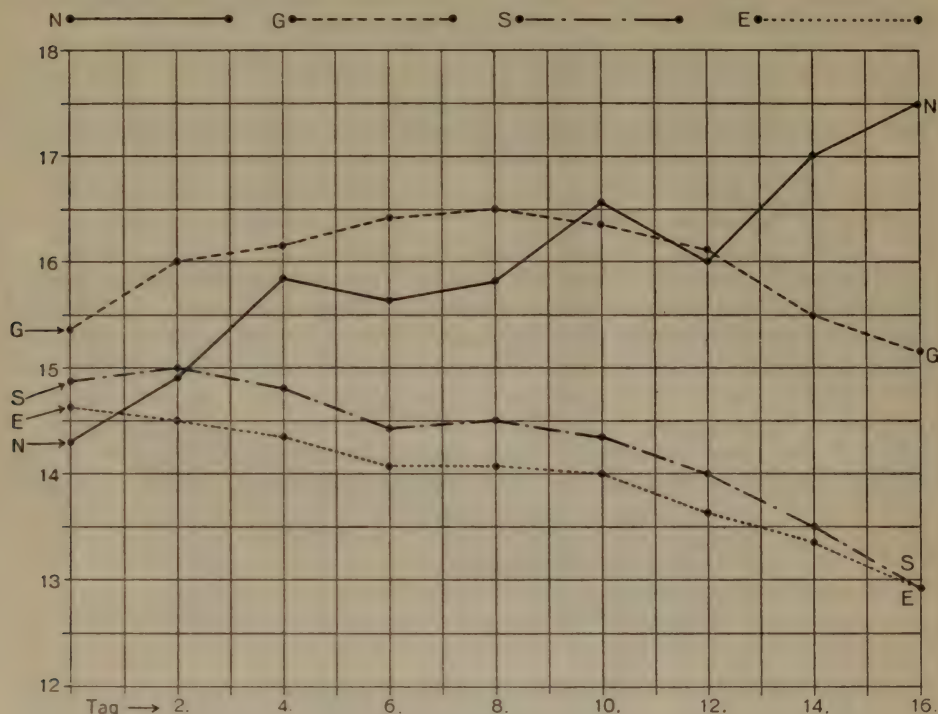
Der geschälte Reis wurde mehrmals mit Leitungswasser gewaschen, um alle etwa noch anhaftenden Reiskleieteilchen zu entfernen, getrocknet und in der Handmühle fein verrieben. Das verwendete Kasein war das von „Merck“ hergestellte käufliche Präparat. Diese Mischgrundnahrung enthielt also reichlich Vitamin A (Lebertran) Vitamin B (Oryzanin) und Vitamin C (Rettigsaft). Ich habe dieses Nahrungsgemisch jeden Tag frisch bereitet den Versuchstieren vorgesetzt.

Auf dieser Mischgrundnahrung, die also alle 3 Vitamine in ausreichender Menge enthielt, bauen sich dann eine Reihe von Versuchen auf, in denen, der den Tieren dargereichten Nahrung jeweils der eine oder andere Vitaminträger, die Salze oder das Eiweiß entzogen wurden. Ueber die Ergebnisse selbst werde ich bei Besprechung der einzelnen Versuche Näheres berichten.

Es muß noch erwähnt werden, daß die Aufnahme dieser Mischgrundnahrung, die sich doch wesentlich von der Gewohnheitsnahrung der Tiere unterschied, zunächst von den Versuchstieren verweigert wurde. Doch schon am 2. Tage gewöhnlich zwang der Hunger die Tiere doch zur Nahrungsaufnahme und einmal an die geänderte Kost gewöhnt, wurde diese von den Tieren in der Folge ohne weiteres angenommen. Unter dem Einflusse dieser Ernährung nahm das Gewicht der Versuchstiere zunächst innerhalb der ersten 8 Fütterungs-

1) Die Collumsche Mischung besteht aus: einbasischem Natriumphosphat 0,347, einbasischem Kalziumphosphat 0,54, Kalzium lacticum 1,30, Magnesium sulfat 0,266, zweibasischem Kalziumphosphat 0,254, zitronensaurem Eisen 0,118.

tage zu, um von da an abzunehmen, doch war der Gewichtsverlust nicht beträchtlich (Kurventafel 1 g). Vereinzelt blieb eine geringe Abnahme des Körpergewichtes von Anfang und während der ganzen Dauer des Versuches bestehen, ebenso wie manchmal das Absinken nach dem 8. Tage ausblieb. Das Durchschnittsverhalten der Gewichtsmaße der Versuchstiere bei Mischgrundnahrung gibt die Kurventafel 1 E wieder.



Kurve 1.

Es ließ sich bei der Verfütterung dieser Mischgrundnahrung häufig auch eine Beeinflussung des Aussehens des Haarkleides beobachten, die, wenn auch keinen Haarausfall, wie beispielsweise bei der Fütterung salzarmer Nahrung, so doch einen Verlust des Fettglanzes des Haarkleides herbeiführte. Anderweitige Folgewirkungen dieser Art der Ernährung wie etwa Verminderung der Beweglichkeit und Lebhaftigkeit oder Herabsetzung der Freßlust usw. konnte nicht festgestellt werden.

3. Eiweißarme Nahrung.

Bei dieser Fütterung der Versuchstiere wurde das in der Mischgrundnahrung enthaltene Kasein weggelassen und im gleichen Gewichtsverhältnisse durch Mehrzugabe von weißem Reispulver ersetzt, so daß statt 77 nunmehr 87 Gewichtsteile Reispulver in der Nahrung enthalten waren.

Bei dieser Ernährungsweise war schon vom Beginne der Fütterung an eine stetige Abnahme des Körpergewichtes der Versuchstiere (Kurventafel 1 E) zu beobachten, die in der weiteren Folge auch von einer Abnahme des Haarglanzes begleitet war, jedoch, ohne daß sonst das allgemeine Befinden der Tiere (Munterkeit, Freßlust) wesentlich in Mitleidenschaft gezogen erschien.

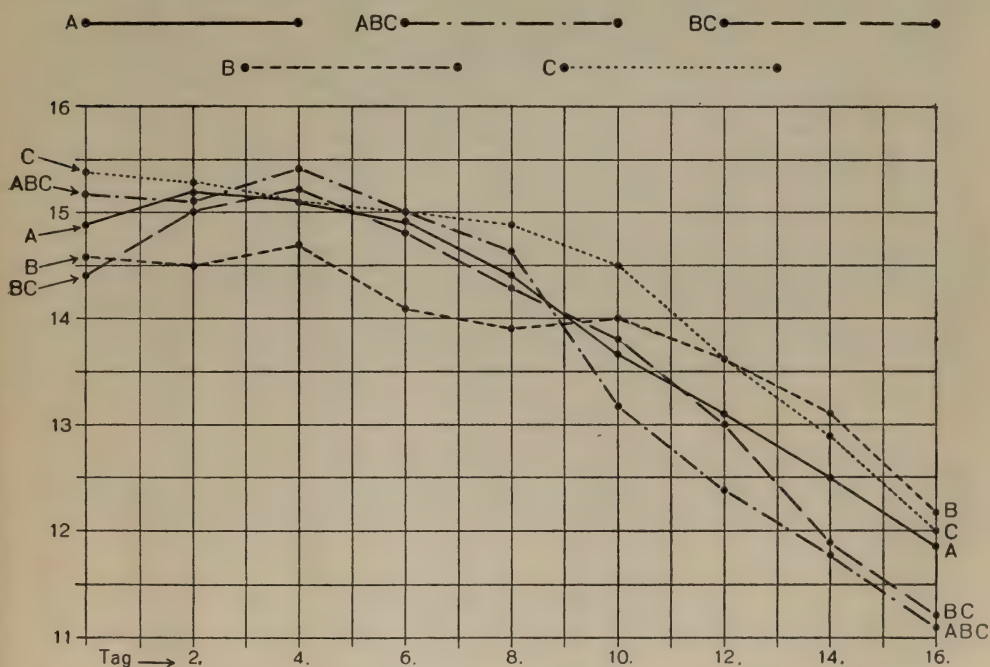
4. Salzarme Nahrung.

Diese Nahrung entsprach in ihrer Zusammensetzung der Mischgrundnahrung (s. S. 415) nur wurde die dieser beigefügte Salzmischung vollkommen weggelassen und im selben Gewichtsverhältnisse durch Mehrgabe von Reispulver ersetzt.

Auch bei dieser Ernährungsweise zeigte sich (Kurve 1 S) eine stetige, wenn auch nicht sehr beträchtliche Gewichtsabnahme der Versuchstiere von Anfang an, und nach 8tägiger Fütterung nahm zunächst der Haarglanz ab, dem dann ausgesprochener Haarausfall folgte. Die nachteiligen Folgen dieses Salzentzuges aus der Mischgrundnahrung auf den allgemeinen Zustand äußerten sich vor allen Dingen im ganzen Geben der Versuchstiere, die alle Munterkeit umsomehr einbüßten, je länger die Versuchsnahrung gereicht wurde. Schließlich bewegten sich die Tiere überhaupt nur mehr träge und schleppend.

5. Vitaminfreie Ernährung.

Aus der Mischgrundnahrung wurden die Vitaminträger Lebertran (A) Oryzaninextrakt (B) und Rettigsaft (C) herausgenommen, so daß also nur mehr eine Nahrung gereicht wurde, die sich lediglich aus Pulver von geschältem Reis (86,4 Proz.) Kasein (10 Proz.) und Salzmischung (3,6 Proz.) zusammensetzte. Ueberdies war diese Nahrung fettfrei.



Kurve 2.

Die ersten 4—6 Versuchstage hielt sich das Körpergewicht ziemlich auf den Ausgangswerten und es blieb auch die Freßlust erhalten. Von diesem Zeitpunkte an wird dann eine deutliche Abnahme der Freßlust erkennbar und das Körpergewicht sinkt stetig ab (Kurve 2 ABC).

Das Haarkleid verliert seinen Glanz. Die Bewegungen werden träge und mühsam, niemals aber wurde hier und ebenso auch bei den nächstfolgenden Versuchen, jener Haarausfall beobachtet, der bei den Fütterungsversuchen

mit salzarmer Nahrung so deutlich in Erscheinung trat. Um eine deutliche Vorstellung vom Einflusse des Entzuges sämtlicher oder einzelner Vitamine in der Ernährung der Versuchstiere auf das Körpergewicht derselben (Kurventafel 2) zu erhalten, ist es notwendig, jene Gewichtskurve zum Vergleiche heranzuziehen, die man bei Fütterung mit Mischgrundnahrung (Kurventafel 1 g) erhalten hat. Dabei zeigt sich, wie schon erwähnt, daß bei der auch den Vitaminversuchen zur Kontrolle dienenden Mischgrundnahrung die Versuchstiere innerhalb der gleichen Versuchszeit und zu Ende derselben nach vorübergehender geringer Zunahme etwa ihr Anfangsgewicht aufweisen, also weder zu- noch abgenommen haben. Ein Vergleich der Körpergewichtskurven in den beiden Tafeln 1 und 2 führt die Folgen des Vitaminentzuges aus der Mischgrundnahrung auf das Körpergewicht der Versuchstiere viel anschaulicher vor Augen, als wie durch die später folgende Zahlentabelle erreicht werden kann (s. Tab. II).

6. Vitamin A freie Nahrung.

Nachdem sich bei Entfernung aller Vitamine aus der Mischgrundnahrung eine so starke Abnahme des Körpergewichtes gezeigt hatte, war es von größtem Interesse, zu erfahren, welches der 3 Vitamine bei Entzug aus der Nahrung vorwiegend in dieser Beziehung als Faktor in Betracht komme. Aus diesem Grunde wurde derselbe Versuch unter jeweiligem Entzug eines einzelnen Vitamins wiederholt. Um das Vitamin A aus der Mischgrundnahrung zu entfernen, wurde dieser kein Lebertran zugesetzt und die fehlende Gewichtsmenge durch geschälten Reis ersetzt. Dieser Entzug des Vitamins A, das derzeit noch nicht aus den Fetten isoliert werden kann, brachte es aber naturgemäß auch mit sich, daß diese Mischgrundnahrung ohne Vitamin A zugleich eine fettfreie Nahrung war. Ich werde später darauf noch zurückzukommen haben.

Bei dieser Vitamin A und fettfreien Ernährung scheinen sich die Tiere anfangs wohl zu befinden, die Freßlust ist nicht vermindert und das Gewicht bleibt durch 5—6 Tage stationär, nimmt sogar manchmal innerhalb dieser ersten Fütterungsperiode zu. Als äußeres Zeichen einer Schädigung ist lediglich eine Abnahme des Haarglanzes erkennbar. Etwa vom 6. Tage an beginnt mit verstärktem Schwinden des Haarglanzes eine immer weiter schreitende Abnahme des Körpergewichtes und gegen Ende der 2. Woche werden die Tiere apatisch, unbeweglich und auch die Freßlust ist nur mehr gering.

7. Vitamin B freie Nahrung.

Hier wurde aus der Mischgrundnahrung nur der Oryzaninextrakt herausgenommen und im Gewichtsverhältnis durch geschälten Reis ersetzt. Vitamin A und C waren in Form von Lebertran und Rettigsaft in der Nahrung erhalten geblieben.

Im wesentlichen verhalten sich die Tiere unter dem Einflusse dieser Ernährung wie jene, denen das Vitamin A und Fett entzogen worden war. Auch hier ist der Gewichtsverlust zu Ende der Versuchszeit ausgesprochen und beträchtlich, doch setzt er etwas später (Kurventafel 2 B), und zwar erst am 10. Tage ein. Verlust des Haarglanzes, der Freßlust und Beweglichkeit tritt deutlich in Erscheinung und bei einer Maus (unter 24 Versuchstieren) wurde das Auftreten deutlicher Paräsen der Hinterbeine beobachtet.

8. Vitamin C freie Ernährung.

Bei Entzug des Vitamin C (Rettigsaft) bleibt das Körpergewicht durch die ersten 8—10 Versuchstage stationär (Kurventafel 2 C) fällt dann aber rasch ab und zeigt zu Ende der Versuchsperiode einen Verlust von etwa 20—25 Proz. des ursprünglichen Gewichtes.

9. Vitamin B und C freie Ernährung.

Hier wurden Oryzaninextrakt und Rettigsaft in der Mischgrundnahrung durch gleiche Gewichtsteile geschälten Reis ersetzt. Die Gewichtskurve (Kurvetafel 2 C B) zeigt deutlich den frühzeitig einsetzenden Gewichtsverlust, der von Abnahme des Haarglanzes, der Freßlust und Beweglichkeit begleitet wurde.

Infektionsversuche.

Ich habe, wie ich schon eingangs erwähnte, meine Versuche zunächst ausschließlich darauf eingestellt, experimentell festzustellen, wie sich unter dem Einflusse verschiedener Ernährung die Widerstandskraft der Versuchstiere gegen Infektion verhält.

Zur Infektion benützte ich Mäusetyphusbazillen, 24stünd. Agarkulturen wurden in physiol. Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Um eine möglichst gleichmäßige, klümpchenfreie Bakterienemulsion zu erhalten, wurde die Aufschwemmung durch sterile Papierfilter geschickt. Die Dichte der Emulsion, d. h. die Keimzahl wurde mittels des Bakteriometers von Fukuhara bestimmt. Dasselbe stellt eine am Ende pipettenartig und dünnausgezogene kleine Eprouvette dar, die am dünnen Ende eine sehr feine Graduierung aufweist, von der jeder Teilstrich 0,001 ccm entspricht. In ein solches Bakteriometer wurden 1 ccm der Stammemulsion übertragen, und stets durch 1 Std. in einer Zentrifuge mit 2500 Umdrehungen die Bakterien ausgeschleudert. Die Höhe des Sedimentes an den Teilstrichen abgelesen, zeigte mir jeweils den Bakteriengehalt der Stammlösung an und ich konnte diese somit für die einzelnen Versuche stets gleichmäßig durch entsprechendes Verdünnen mit physiologischer Kochsalzlösung einstellen. Die für die Infektion verwendete Injektionsmenge war also für jeden Versuch gleichmäßig bestimmbar.

Da sich bei den verschiedenen Fütterungsversuchen mit unvollkommener Nahrung gezeigt hatte, daß als Folge einzelner Arten der Ernährung die Versuchstiere in größerer Zahl nach 20tägiger Fütterung eingingen, so habe ich die Infektionsversuche am 16., später am 12. und 8. Tage der jeweiligen Fütterung vorgenommen, um die zu diesem Zeitpunkte bestehende Widerstandskraft zu prüfen.

Zunächst versuchte ich an den mit ihrer Gewohnheitsnahrung gefütterten Mäusen die Dosis letalis meines Mäusetyphusstammes festzustellen. Wie aus der Tabelle I ersichtlich ist, ließ sich in 3maliger Wiederholung des Versuches eine

Tabelle I.

Feststellung der Dosis minima letalis bei mit Gewohnheitsnahrung gefütterten Mäusen.

	Zahl der Versuchstiere	Bakterienmenge pro gr Körpergewicht	Tod	Überleben	Summe	
					Tod	Überleben
I. Versuch	2	0,04	2	0	6	0
II. „	2	0,04	2	0		
III. „	2	0,04	2	0		
I. Versuch	2	0,02	1	1	3	3
II. „	2	0,02	1	1		
III. „	2	0,02	1	1		
I. Versuch	2	0,01	1	1	2	4
II. „	2	0,01	0	2		
III. „	2	0,01	1	1		
I. Versuch	2	0,005	0	2	0	6
II. „	2	0,005	0	2		
III. „	2	0 005	0	2		

Menge von 0,04 Teilstrichen Bakteriensediment pro Gramm des Körpergewichtes der Maus ziemlich genau als Dosis letalis abgrenzen. Diese so ermittelte Dosis galt nunmehr als Vergleichsbasis für die verschiedenen Versuche. Nach Feststellung der Dosis letalis wurden nämlich die Infektionen in der Weise vorgenommen, daß jeweils die einfache, halbe, ferner $\frac{1}{4}$ und $\frac{1}{8}$ der letalen Dosis gegeben wurde, so daß die jeweils vorhandene Widerstandskraft der Versuchstiere aus dem Vergleichswerte zur einfach tödlichen Dosis ermittelt werden konnte. Die Ergebnisse der einzelnen Versuche sind in Tabelle II zusammen-

Tabelle II.

Ergebnisse der Prüfung auf die Widerstandskraft weißer Mäuse nach verschiedener qualitativ unvollkommener Ernährung gegenüber Mäusetyphusbazillen. Die Resultate geben die perzentuellen Durchschnittszahlen aus je drei gleichen zeitlich getrennt durchgeführten Einzelversuchen wieder. Zu jedem Einzelversuche wurden 8 Versuchstiere verwendet. Der Infektion ging bei diesem Versuche eine 16tägige Fütterung voraus.

Art der Ernährung	Verhalten des Körpergewichtes nach 16 Versuchstagen	Menge der injizierten Bakterien pro gr	Tod der Versuchstiere in Prozenten	Anmerkung
1. Gewohnheitsnahrung	beträchtliche Zunahme 22 %	0,04 0,02 0,01 0,005	100 % 50 „ 25 „ 0 „	Dosis letalis 0,04
2. Mischgrundnahrung	stationär	0,04 0,02 0,01 0,005	100 % 50 „ 25 „ 0 „	keine Abnahme der Resistenz
3. Eiweißarme Nahrung	Abnahme 11,6 %	0,04 0,02 0,01 0,005	100 % 50 „ 25 „ 20 „	Abnahme der Resistenz
4. salzarme Nahrung	Abnahme 13,4 %	0,04 0,02 0,01 0,005	100 % 100 „ 60 „ 40 „	deutliche Abnahme der Resistenz
5. vitaminfreie Nahrung	Abnahme 27,6 %	0,04 0,02 0,01 0,005	100 % 100 „ 80 „ 0 „	deutliche Abnahme der Resistenz
6. Vitamin A und fettfreie Nahrung	Abnahme 20 %	0,04 0,02 0,01 0,005	100 % 84 „ 65 „ 25 „	deutliche Abnahme der Resistenz
7. Vitamin B freie Nahrung	Abnahme 16,4 %	0,04 0,02 0,01 0,005	100 % 50 „ 0 „ 0 „	keine Abnahme der Resistenz
8. Vitamin C freie Nahrung	Abnahme 22 %	0,04 0,02 0,01 0,005	100 % 32 „ 16 „ 16 „	keine Abnahme
9. Vitamin B und C freie Nahrung	Abnahme 22 %	0,04 0,02 0,01 0,005	100 % 16 „ 32 „ 0 „	keine Abnahme

gefaßt. Die diesen Werten entsprechenden Bakterienmengen wurden stets in 1 cc, physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, und mit stumpfer Injektionsnadel intraperitoneal injiziert. Bei jedem Versuche wurde überdies die gleiche Anzahl normaler Versuchstiere zur Kontrolle mit infiziert, um Versuchsfehler, die sich aus eventuellen Schwankungen der Virulenz des Stammes bei zeitlich getrennten Versuchen ergeben konnten, auszuschalten. Für die Beurteilung des Ausfalles eines Versuches wurde eine Beobachtungszeit von 24 Std. nach erfolgter Infektion auf Grund der Vorproben gewählt. Daß sich nicht immer absolut scharfe Grenzen erzielen ließen, die in allen Versuchen haargenau übereinstimmend waren, liegt in der Natur des Experimentes resp. der Individualität der Versuchstiere. Aus diesem Grunde wurde eben jeder Einzelversuch mindestens 3mal unter möglichst gleichen Bedingungen wiederholt, um auf solche Weise verwertbare perzentuelle Vergleichswerte zu erhalten.

Aus der Tabelle II ist zu ersehen (vergleiche auch Kurventafel 1 und 2), daß im Vergleiche zur Gewohnheitsnahrung, resp. zur Mischgrundnahrung, die stärksten Körpergewichtsverluste zunächst bei völlig vitaminfreier Ernährung eintraten. Dann folgen der Reihe nach in bezug auf Abnahme Vitamin B und C freie, Vitamin C freie, Vitamin A, Vitamin B freie Kost, ferner die salzarme und zuletzt die eiweißarme Ernährung.

Betrachten wir in bezug auf diese Abnahme des Körpergewichtes den damit in Zusammenhang zu bringenden Einfluß auf die Verminderung der Widerstandskraft der Versuchstiere gegen die Infektion mit Mäusetyphus, so ergibt sich folgendes.

Bei den mit salzarmer, vitaminfreier, ferner Vitamin A freier Nahrung ernährten Tieren, zeigte sich eine deutliche Herabminderung der Resistenz gegenüber der Infektion, in Uebereinstimmung mit der Abnahme des Körpergewichtes. Das gleiche, wenn auch weniger ausgeprägt, gilt für die eiweißarm ernährten Tiere.

Dagegen zeigen diejenigen Versuchstiere, welche mit Vitamin B und C freier, oder B oder C Vitamin freier Nahrung ernährt wurden, keine Herabminderung der Resistenz gegen Infektion mit Mäusetyphus, obwohl ihr Körpergewicht zufolge dieser Ernährungsweise stark abgenommen hatte. Bei diesen Gruppen besteht also zwischen der Abnahme des Körpergewichtes und der Resistenz gegen Infektion kein sichtbarer Zusammenhang, was für die Beurteilung dieser ganzen Frage von wesentlicher Bedeutung sein wird.

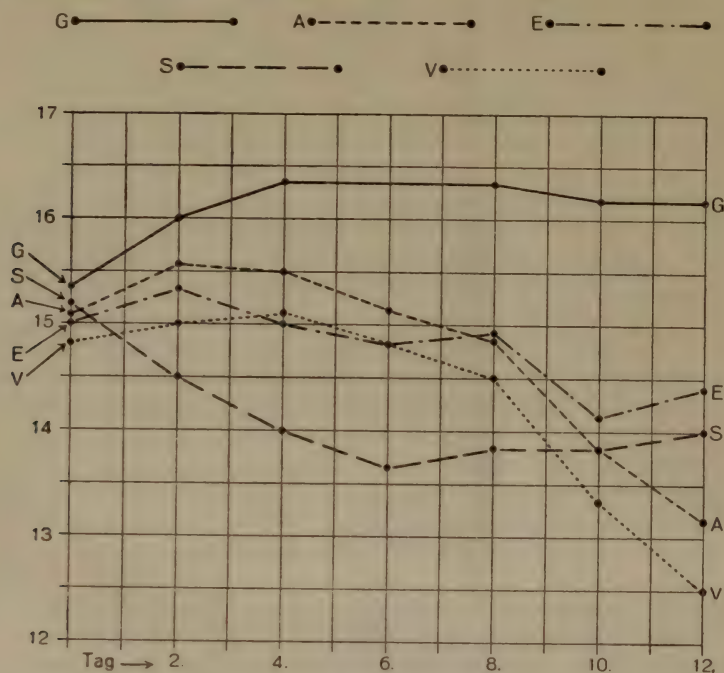
Auch beim Vergleiche dieser Vitamin B und C frei ernährten Gruppen mit den salz- oder eiweißfrei ernährten Tieren, die im Verlaufe des Versuches an Gewicht viel weniger verloren haben, ergibt sich, daß diese letzteren dennoch an Widerstandskraft beträchtlich mehr eingebüßt hatten.

Die Abnahme des Körpergewichtes, die im Gefolge des Entzuges bestimmter Substanzen in der Ernährung eintritt, ist also an sich kein gültiger Indikator für die verbleibende natürliche Resistenz gegenüber der Infektion, da beide Werte zueinander nicht in unmittelbarer Beziehung stehen.

Einfluß der Zeitdauer der Fütterung mit qualitativ unvollkommener Ernährung.

Um zu erfahren, ob die oben erhaltenen Versuchsergebnisse grundlegend richtig seien, wurde die Zeitdauer der einzelnen Fütterungen abgekürzt, und zwar zunächst auf 12 und dann auf 8 Tage beschränkt. Da zufolge der immer kürzer gewählten, abnormalen Ernährungsverhältnisse die Folgen derselben sich auch weniger stark ausprägen mußten, war es von größtem Interesse, vergleichsweise das Verhalten der relativ noch weniger durch die mangelhafte Ernährung

geschädigten Tiere zu prüfen, wobei wiederum Körpergewicht und Widerstandskraft in Relation gebracht werden sollten.



Kurve 3.

Tabelle III.

Ergebnisse der 12tägigen Fütterung mit qualitativ unvollkommener Nahrung.

Art der Ernährung	Verhalten des Körpergewichtes nach 12 Versuchstagen	Menge der injizierten Bakterien pro gr	Tod der Versuchstiere in Prozenten	Anmerkung
Mischgrundnahrung	Zunahme 5,4 %	0,04 0,02 0,01 0,005	100 % 50 „ 20 „ 0 „	Dosis letalis 0,04
Eiweißarme Nahrung	Abnahme 4 %	0,04 0,02 0,01 0,005	100 % 75 „ 0 „ 0 „	
Salzarme Nahrung	Abnahme 7,8 %	0,04 0,02 0,01 0,005	100 % 100 „ 75 „ 30 „	
Vitaminfreie Nahrung	Abnahme 15,5 %	0,04 0,02 0,01 0,005	100 % 75 „ 75 „ 30 „	
Vitamin A freie Nahrung	Abnahme 13 %	0,05 0,02 0,01 0,005	90 % 25 „ 25 „ 25 „	

Was zunächst das Verhalten des Körpergewichtes nach 12tägiger Fütterung betrifft, so gibt darüber Kurventafel 3 Aufschluß. Wir sehen im Vergleiche zu der sich etwas hebenden Gewichtskurve bei Mischgrundnahrung, die Gewichtskurven der Vitamin A, B und C, sowie Vitamin A freien, der salz- und eiweißarm ernährten Tiere sinken, doch betragen die Gewichtsverluste (Tab. III) bei weitem nicht jene Werte, wie nach 16tägiger Fütterung. Was nun die Einflußnahme dieser Ernährungsweise auf die Widerstandskraft der Versuchstiere gegen Infektion anlangt, so gibt uns ebenfalls darüber Tabelle III entsprechende Auskunft.

Wir sehen die größte Gewichtsabnahme (15½ Proz.) bei vitaminfreier und Vitamin A freier (13 Proz.) Ernährung eintreten und doch hat die natürliche Widerstandskraft gegen Infektion analog den früheren Ergebnissen bei salzarmer Ernährung, und zwar bei viel geringerem Verluste an Körpergewicht (7,8 Proz.) doch stärker gelitten, als bei den Vitamin frei ernährten Tieren. Die eiweißfrei ernährten Tiere zeigen zu diesem Zeitpunkte des Versuches noch keine wesentliche Herabsetzung der Resistenz, obwohl die Prozentzahl der gestorbenen Tiere bei Injektion der halben tödlichen Dosis etwas erhöht ist. Ein solches Schwanken der perzentuellen Zahl erfolgt sofort, wenn 1 oder 2 Tiere des Versuches infolge individueller Verschiedenheiten aus der Reihe treten. Dagegen ist in diesem Versuche z. B. bei Injektion von ¼ der letalen Dosis keines der Versuchstiere gestorben, obgleich im Kontrollversuche etwa 20 Proz. der Tiere durchschnittlich dieser Dosis erliegen. Das sind eben Schwankungen, die sich nicht vermeiden lassen, aber doch bei der Zusammenfassung aller Versuchsergebnisse wieder ihre Korrektur erfahren. So kommt z. B. die beträchtliche Herabsetzung der Widerstandskraft respektive die Schädigung der salzarm ernährten Tiere in jedem Versuche immer wieder in der erhöhten Sterblichkeit doch ganz deutlich zum Ausdrucke und diese Schädigung gibt sich auch vorher schon durch Haarausfall und Verminderung der Beweglichkeit zu erkennen. Bei den Vitamin frei ernährten fehlt der Haarausfall zwar, aber die Beweglichkeit und der Haarglanz nehmen doch sichtlich ab.

Es tritt also bei salzarm und vitaminfrei oder Vitamin A frei ernährten Mäusen schon nach 12tägiger Fütterung eine deutliche Herabsetzung der natürlichen Resistenz gegen Infektion in Erscheinung, die jedoch als solche nicht dem Körpergewichtsverluste parallel geht.

Ergebnisse nach 8tägiger Fütterung qualitativ unvollkommener Nahrung.

Bei 8tägiger Fütterung mit verschiedener qualitativ unvollkommener Nahrung konnte ein deutlicher Einfluß auf das Verhalten des Körpergewichtes allgemein und bei salzarmer Fütterung auch auf das Aussehen der Versuchstiere (Haarglanz usw.) beobachtet werden. Dagegen konnte in dieser Versuchsperiode noch kein wesentlich schädigender Einfluß auf die Widerstandskraft im Sinne einer Herabsetzung derselben auch nicht bei salzarmer Fütterung konstatiert werden.

Versuche mit quantitativ unzureichender Ernährung.

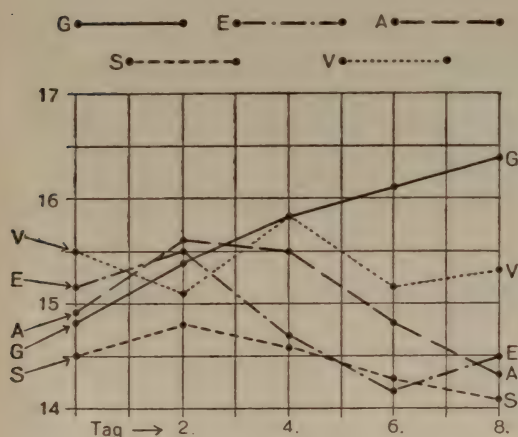
Es schien mir, nachdem ich den Einfluß des Fehlens bestimmter Substanzen in der Nahrung auf die natürliche Widerstandskraft geprüft hatte, von Interesse, die Wirkung von Hungerernährung in Form einer quantitativ herabgesetzten Nahrung zu studieren.

Als Kontrolle wurde wieder die schon in den früheren Versuchen gebrauchte Mischgrundnahrung verwendet. Ich hatte in vorangegangenen Versuchen

Tabelle IV.

Ergebnisse der Stägigen Fütterung mit qualitiv unvollkommener Nahrung.

Art der Ernährung	Verhalten des Körpergewichtes nach 8 Versuchstagen	Menge der injizierten Bakterien pro gr	Tod der Versuchstiere in Prozenten	Anmerkung
Mischgrundnahrung	Zunahme 11,5 %	0,04 0,02 0,01 0,005	90 % 85 „ 25 „ 0 „	Dosis letalis 0,04
eiweißarme Nahrung	Abnahme 4,6 %	0,04 0,02 0,01 0,005	100 % 25 „ 25 „ 25 „	
salzarme Nahrung	Abnahme 2,7 %	0,04 0,02 0,01 0,005	100 % 75 „ 25 „ 0 „	
vitaminfreie Nahrung	Abnahme 4,5 %	0,04 0,02 0,01 0,005	90 % 50 „ 25 „ 0 „	
Vitamin A freie Nahrung	Abnahme 4 %	0,04 0,02 0,01 0,005	100 % 50 „ 25 „ 25 „	



Kurve 4.

festgestellt, daß die einzelnen Versuchstiere in den ersten 12 Tagen von der Mischgrundnahrung durchschnittlich zwischen 2—3 g täglich konsumierten, von dieser Zeit aber trat verminderte Freßlust auf und die Tiere nahmen nur mehr, etwa 1 g dieser Nahrung täglich zu sich und gleichzeitig nahmen sie an Körpergewicht ab.

Ich setzte nun auf Grund dieser Feststellung die Tiere durch 12 Tage, eine Zeit, in der sie sonst täglich 2—3 g der Mischgrundnahrung konsumierten, auf ausgesprochene Hungernahrung.

kost, indem ich ihnen nur 1 g dieser Nahrung pro Tag und Tier verabreichte.

Unter dem Einflusse dieser Hungernahrung verlieren die Tiere nicht nur erheblich an Körpergewicht (Kurventafel 5 H) sie werden träge, fast unbeweglich und verlieren völlig ihren Haarglanz, sondern auch ihre Widerstandskraft gegen Infektion mit Mäusetypusbazillen wird erheblich herabgesetzt (Tab. V).

Die Hungernahrung als solche hatte also an der Mischgrundnahrung gemessen einen ausgesprochen schädigenden Einfluß auf die Versuchstiere in bezug auf ihre Widerstandskraft.

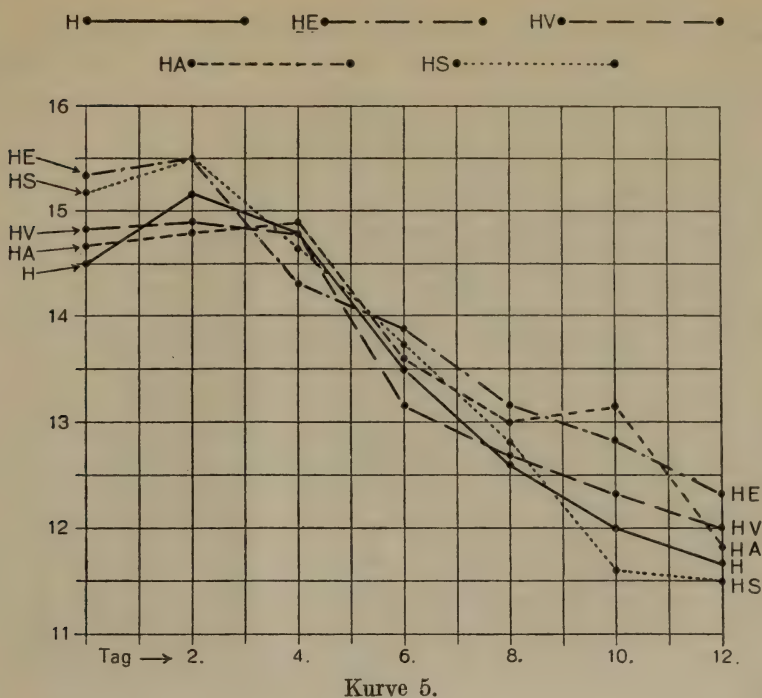


Tabelle V.

Ergebnisse nach 12tägiger Fütterung mit Hungernahrung.

Art der Ernährung	Verhalten des Körpergewichtes nach 12 Tagen	Menge der injizierten Bakterien pro Gramm	Tod der Versuchstiere in Prozenten	Anmerkung
Halbe Mischgrundnahrung = Hungernahrung	Abnahme 19 Proz.	0,04 0,02 0,01 0,005	100 Proz. 100 „ 50 „ 30 „	Die an normal gefütterten Tieren festgestellte Dosis letalis = 0,04 pro Gramm Maus
Halbe Mischgrundnahrung, Zusatz Vitamin A	Abnahme 19 Proz.	0,04 0,02 0,01 0,005	100 Proz. 100 „ 50 „ 30 „	
Halbe Mischgrundnahrung, Zusatz Vitamin A, B und C	Abnahme 19 Proz.	0,04 0,02 0,01 0,005	100 Proz. 100 „ 50 „ 30 „	
Halbe Mischgrundnahrung, Zusatz Kasein	Abnahme 12 Proz.	0,04 0,02 0,01 0,005	100 Proz. 75 „ 25 „ 25 „	
Halbe Mischgrundnahrung, Zusatz Salze	Abnahme 24 Proz.	0,04 0,02 0,01 0,005	100 Proz. 75 „ 50 „ 50 „	

Ich wollte nun feststellen, ob diese schädliche Wirkung der Hungernahrung ganz oder teilweise dadurch kompensiert werden könne, wenn in der Hunger-

nahrung abwechselnd einzelne Bestandteile derselben in dem Ausmaße mehr beigemischt wurden, wie diese sonst in der normaler Weise konsumierten Nahrungsmenge enthalten ist.

Aus dem früher erwähnten Grundversuch, bei welchem festgestellt wurde, daß die Tiere innerhalb der ersten 12 Versuchstage zwischen 2—3 g Mischgrundnahrung zu ihrer vollen Ernährung brauchten, ließ sich feststellen, wieviel dies für jeden der einzelnen Bestandteile, aus denen sich diese Nahrung zusammensetzt, pro Tag und Tier betrug. Dann wurde diese betreffende Substanz der im übrigen mit 1 g bemessenen Hungernahrung in der Weise erhöht beigegeben, daß sie nunmehr doch in derselben Menge wie bei normalem Konsum auch in der Hungernahrung enthalten war. Während z. B. beim einfachen Hungerversuch durch Darreichung des halben Nahrungsbedarfes auch das damit verabreichte Eiweiß (Kasein) in halber Menge gegeben wurde, wurde nun der modifizierte Hungerversuch mit Eiweißmehrgabe so eingestellt, daß in der den Tieren gereichten Menge des halben Nahrungsbedarfes doch der darin enthaltene Eiweißbestandteil verdoppelt war, also im Gewichtsverhältnisse dem im vollen Nahrungsbedarf enthaltenen Anteil entsprach. Bei ausreichend dargereicherter Mischgrundnahrung frißt eine Maus täglich z. B. 2 g und darin sind 0,2 g Kaseineiweiß enthalten. Im einfachen Hungerversuch erhielt sie die Hälfte, also 1 g mit nur 0,1 g Eiweiß und im modifizierten Hungerversuch 1 g Mischgrundnahrung mit auf 0,2 erhöhtem Kaseingehalt. Die entsprechend geringgradige Gewichtskorrektur in der Mischung war durch Abzug am Gewichte des beigefügten Reispulvers leicht vorzunehmen, so daß alle anderen Substanzen in ihrer perzentuellen Zusammensetzung der Mischgrundnahrung unberührt blieben.

In dieser Weise wurde dann in der quantitativ unzureichenden Hungernahrung einmal der Eiweiß-, ein anders Mal der Salz- oder der Vitamingehalt erhöht. Ueber den Erfolg geben Kurventafel 5 und Tabelle V Auskunft.

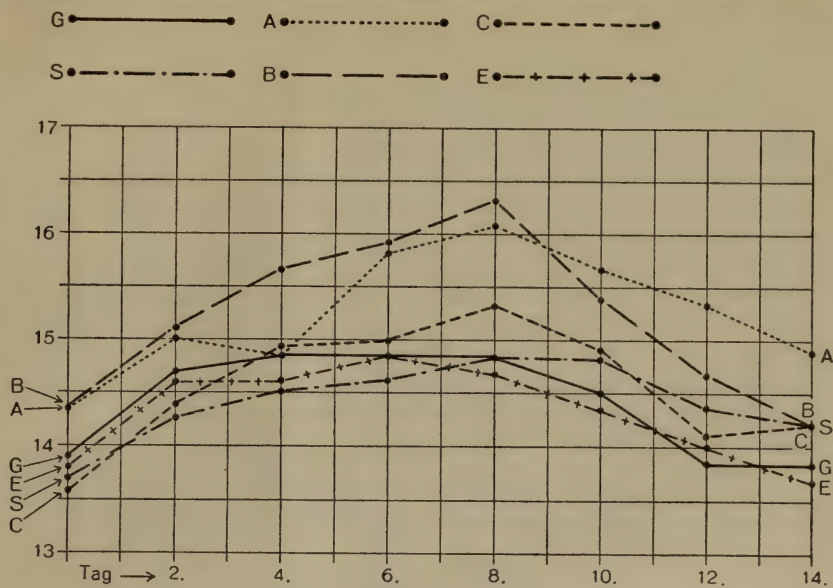
Es gelingt demnach nicht die durch Hungernahrung gesetzten Schädlichkeiten, wie Herabminderung des Körpergewichtes, der Beweglichkeit, der Widerstandskraft gegen Infektion usw. dadurch auszugleichen oder abzuschwächen, daß man einzelne Bestandteile der Hungernahrung quantitativ erhöht, wenn die Nahrungsmenge als solche einer Hungerkost gleichkommt.

Ernährungsversuche zur Steigerung der Widerstandskraft gegen Infektion.

Während alle meine bisher angeführten Versuche darauf abzielten, zu erforschen, unter welchen Ernährungsbedingungen die natürliche Resistenz der Versuchstiere herabgesetzt wird, habe ich in der nun zu besprechenden Versuchsreihe geprüft, ob es durch Vermehrung bestimmter Stoffe in der Nahrung nicht erreichbar wäre, die Widerstandskraft der Versuchstiere zu steigern.

Ich habe wieder als Vergleichsbasis die Mischgrundnahrung gewählt, deren genaue Zusammensetzung auf S. 415 angegeben wurde und von der ich experimentell feststellen konnte, daß sie innerhalb einer bestimmten Versuchszeit als Nahrung gereicht keinen ersichtlich schädlichen Einfluß ausübt. Da sie gleichzeitig aus einzelnen genau bekannten Substanzen in ganz bestimmten Gewichtsverhältnissen zusammengesetzt ist, so eignet sie sich ausgezeichnet zum Vergleiche für alle jene Versuche, in denen die Nahrung qualitativ oder quantitativ verändert dem Versuchstiere dargeboten werden soll. Da überdies diese Mischgrundnahrung zu 77 Proz. aus Pulver von geschältem Reis besteht, ist es leicht, jede Verschiebung oder Veränderung des perzentuellen Anteiles irgendeines anderen Bestandteiles der Mischung durch entsprechende Korrektur

im Reispulverzusatz auszugleichen, ohne durch diesen letzteren Umstand allein das perzentuelle Mischungsverhältnis irgend erheblicher zu stören.



Kurve 6.

Tabelle VI.

Ergebnisse der Ernährung mit qualitativem Nahrungsüberschuß.

Art der Ernährung	Verhalten des Körpergewichtes nach 14 Tagen	Menge der injizierten Bakterien pro Gramm	Tod der Versuchstiere in Prozenten	Anmerkung
Vollfütterung mit Mischgrundnahrung	Gleich dem Anfangsgewicht	0,04	100 Proz.	Dosis minima letalis 0,04
		0,02	50 „	
		0,01	25 „	
		0,005	0 „	
Zugabe von Vitamin A	Zunahme 4 Proz.	0,04	100 Proz.	
		0,02	50 „	
		0,01	25 „	
		0,005	0 „	
Zugabe von Vitamin B	Gleich dem Anfangsgewicht	0,04	100 Proz.	
		0,02	50 „	
		0,01	30 „	
		0,005	0 „	
Zugabe von Vitamin C	Zunahme 5 Proz.	0,04	100 Proz.	
		0,02	0 ??	
		0,01	25 Proz.	
		0,005	25 „	
Zugabe von Kasein	Gleich dem Anfangsgewicht	0,04	100 Proz.	
		0,02	50 „	
		0,01	25 „	
		0,005	25 „	
Zugabe von Salzen	Zunahme 4 Proz.	0,04	100 Proz.	
		0,01	50 „	
		0,01	25 „	
		0,005	0 „	

Ausgehend nun von der Zusammensetzung der Mischgrundnahrung, die selbst nach 14tägiger Fütterung keinerlei Schädigung der natürlichen Resistenz hervorruft, habe ich diese jeweils durch entsprechend prozentuelle Erhöhung der einen oder anderen Grundkomponente verändert, in der Voraussetzung, daß es möglich sei, im Vergleiche zu der genau bekannten Wirkung der unveränderten Grundnahrung, dadurch in einem oder anderen Falle durch ein Ueberangebot gewisser Stoffe eine gesteigerte Wirkung etwa im Sinne der Erhöhung der natürlichen Widerstandskraft zu erzielen.

In dieser Weise wurde einmal der Salzgehalt der Mischgrundnahrung, dann das Kasein, ferner Lebertran (Vitamin A) Oryzaninextrakt (Vitamin B) und Rettigsaft (Vitamin C) in je einem Doppelversuch um 50 Proz. erhöht und mit dieser Nahrung die Tiere durch 14 Tage so gefüttert und dann infiziert. Aus der Kurventafel 6 ersieht man, daß durch dieses Ueberangebot von Vitamin sich in allen Fällen, das Körpergewicht bis zum 8. Versuchstag wesentlich gehoben hatte, um von da ab wie bei der als Vergleichsnahrung gereichten Mischgrundnahrung abzusinken. Der Mehrzusatz von Kasein oder Salz blieb in dieser Beziehung hinter der Wirkung der Vitamine zurück.

Was nun die natürliche Resistenz anlangt, so konnte durch dieses Mehrangebot einzelner Substanzen, aus denen sich die Mischgrundnahrung zusammensetzte und wie dies aus der Tabelle VI (S. 427) zu ersehen ist, keinerlei Einwirkung auf diese etwa im Sinne einer Erhöhung erzielt werden.

Zusammenfassung.

Ersetzt man bei weißen Mäusen die Gewohnheitsnahrung (in unserem Falle Hafer und Brot) durch eine sogenannte Mischgrundnahrung (s. S. 415) in der die für die natürliche Ernährung erforderlichen Nahrungsstoffe und Vitamine in genau bekannter und gewogener Menge gemischt vorhanden sind, dann nehmen die Tiere zwar anfänglich an Körpergewicht, und zwar durch etwa 8 Tage hindurch zu, um aber im Verlaufe weiterer 8 Tage diese Zunahme allmählich abzugeben, so daß nach 16tägiger Versuchsdauer etwa das Anfangs- resp. Ausgangsgewicht wieder erreicht wird. Nimmt man nun diese Mischgrundnahrung als Vergleichsbasis für jene Versuche, in denen ganz bestimmte Stoffe aus ihr entfernt wurden und so bei dieser Ernährungsweise gefehlt haben, so zeigt sich in allen Fällen innerhalb der Versuchsdauer von 16 Tagen eine erhebliche Abnahme des Körpergewichtes, die ebenfalls etwa am 8. Versuchstage (bei salzarmer Ernährung früher) einsetzt. Am ausgesprochensten ist diese Gewichtsabnahme bei Vitamin freier Ernährung (27,6 Proz.) dann folgt jene bei Entzug von Vitamin B und C 22 Proz., von Vitamin C 22 Proz., Vitamin A 20 Proz., Vitamin B 16 Proz. und schließlich jene bei salzarmer (13,4 Proz.) und eiweißarmer (11,6 Proz.) Ernährung.

Prinzipiell dasselbe Verhältnis ergibt sich in naturgemäß verringertem Ausmaße, wenn man das jeweilige Körpergewicht der Versuchstiere nach 12 resp. 8tägiger Fütterung feststellt. Prüft man nach 14tägiger Fütterung, so zeigt sich zunächst, daß die mit der Mischgrundnahrung ernährten Tiere dieselbe natürliche Resistenz gegen Infektion mit Mäusetyphusbazillen aufweisen, wie jene Tiere, die ihre natürliche Gewohnheitsnahrung erhalten hatten, daß sie also nicht verringert wurde.

Entzieht man der Mischgrundnahrung in verschiedenen Versuchen abwechselnd einzelne oder alle Vitamine, die Salze oder das Eiweiß, so wird dadurch die natürliche Resistenz der Versuchstiere gegen Infektion fast allgemein herabgesetzt, aber die Widerstandskraft sinkt nicht, wie man eigentlich erwarten sollte in einem bestimmten Verhältnisse zur Abnahme des Körpergewichtes der Versuchstiere, sondern erscheint unabhängig davon betroffen zu werden. Am meisten geschädigt erscheint sie im Gefolge salzarmer Ernährung und vitaminfreier Kost, aber im Vergleiche mit der vitaminfreien Ernährung fällt es auf, daß bei letzterer die Gewichtsabnahme der Versuchstiere doppelt so groß war als dort und dies gilt auch für jene Fälle, wo lediglich Vitamin A in der den Tieren gebotenen Mischgrundnahrung fehlte. Keine Abnahme der Widerstandskraft trat nach Entzug von Vitamin B oder C in Erscheinung, obwohl das Körpergewicht erheblicher abgenommen hatte, als nach salzarmer Ernährung. Dieser Befund ließ sich im wesentlichen auch bei kürzerer Versuchsdauer nach 12tägiger Fütterung in gleicher Weise erheben, aber noch nicht nach 8tägiger Fütterung.

Die Abnahme des Körpergewichtes allein ist also kein Ausdruck für den Grad der jeweils vorhandenen natürlichen Resistenz gegen Infektion. Am stärksten wird die natürliche Resistenz bei salzarmer oder vitaminfreier Ernährung in Mitleidenschaft gezogen, etwas weniger bei Vitamin A und eiweißfreier Ernährung, wogegen bei Mangel von Vitamin B oder C oder beider in der Nahrung keine Beeinflussung der Widerstandskraft trotz Abnahme des Körpergewichtes erhoben werden konnte.

Dieser auffallende Befund erklärte sich daraus, daß bei Entzug des Vitamins A aus der Mischgrundnahrung auch zugleich (Aron) das Fett eliminiert wird, demnach diese Art vitaminfreier Ernährung also zugleich auch eine fettfreie ist.

Wir dürfen wohl annehmen, daß die Widerstandskraft der Versuchstiere am stärksten bei salzarmer, dann bei fettfreier und schließlich eiweißarmer Ernährung leidet, wogegen Entzug von Vitaminen innerhalb der Versuchsperioden einer 8, 12 und 14tägiger Fütterung wohl das Körpergewicht nicht aber die Widerstandskraft herabsetzt.

In Ergänzung dazu durchgeführte Hungerversuche zeigen ebenfalls, daß eine an Salz, Fett oder Eiweiß unzureichende Nahrung eine Abnahme der Widerstandskraft verursacht, die auch dann eintritt, wenn bei Mangel des einen der andere Faktor in ausreichender Menge der Hungernahrung zugesetzt wird.

Ebenso kann durch ein Mehrangebot der einzelnen Substanzen (Salz, Fett, Eiweiß oder Vitamine) in der Grundmischnahrung die natürliche Widerstandskraft nicht erhöht werden.

Zum Schlusse danke ich meinem verstorbenen Lehrer Fukuhara sowie Professor Murata bestens für ihre Anregungen und Herrn Professor B. Busson für seine Unterstützung bei diesen Versuchen.

Literatur.

Aron, H., Berlin. klin. Wochenschr. 1914. — Bieling, Ztschr. f. Hyg. Bd. 101. — Ders., Ebenda. Bd. 102. — Ders., Ebenda. Bd. 104. — Corda, Ebenda. Bd. 100. — D'Asaro-

Beondo, Policlínico. 1922. — Findley a. Marschall, Journ. of Pathol. and Bact. 1923. — Glogye u. Page, Centralbl. f. d. ges. Tuberkulosef. 1923. — Guerrcini, Anna, Ztschr. f. Hyg. 1923. — Hayashi, R., Kioto-Igakkaï-Zasshi. Bd. 23. — Kleinschmidt, H., Berlin. klin. Wochenschr. 1919. — Lange and Simonds, Journ. Amer. Med. Assoc. 1923. — Leichten-tritt, B., Dtsch. med. Wochenschr. 1924. — Ders., Ztschr. f. Hyg. Bd. 102. — Mc Gown, John Pool and Crichton Arther, Centralbl. f. Hyg. 1924. — Mc Collum, E. v., John Hopkins Hospit. Bullet. Vol. 31. p. 33. — Ders., Simonds, N., Becker, T. E. a. Spepley, P. G. The Journ. biol. Chemistry. 1922. — Nagahama, Kekkaku. Bd. 3. Nr. 3. — Nakamura, M., Nisshin-Igaku. Bd. 15. Nr. 6. — Niemann u. Foth, Dtsch. med. Wochenschr. 1919. — Rietschel, H., Med. klin. Wochenschr. 1914. — Shimazono, Z., Nisshin-Igaku. Bd. 15. Nr. 5 u. 6. — Sauerbruch, Münch. med. Wochenschr. 1924. — Setti, Carlo, Biochem. e terapia sperim. 1923. — Stern, Ztschr. f. Kinderheilk. Bd. 36. — Stoeltzner, W., Ergebn. d. inn. Med. u. Kinderheilk. Bd. 24. — Smith, Journ. Amer. med. Assoc. 1923. — Shipley, Park, Mc Collum and Simmonds, Amer. Journ. Hyg. 1921. — Webster and Pritschert, Journ. Exper. Med. Bd. 37 a. Bd. 40.

Nachdruck verboten.

Die erwärmten Virus fixe-Emulsionen von Puscariu und die danach aufgetretenen Lähmungen.

[Aus dem Institut Pasteur in Bandoeng, Java.]

Von Jeanne van den Hoven van Genderen.

Ein Argument, das in der Literatur wiederholt zum Beweise angeführt wird, daß Lähmungen nicht im Virus fixe ihre Ursache haben können, ist das häufige Auftreten derselben (1 : 260 Behandelte) bei der rumänischen Methode, bei der ein durch Erhitzen abgetöteter Impfstoff verwendet wurde.

Während der Jahre 1896—1908 behandelte Puscariu seine Patienten mit Injektionen von 2—3 ccm einer Virus fixe-Emulsion, die in einer Konzentration von ungefähr 1 : 10 bis 1 : 12 (ein Kaninchengehirn auf 100 ccm NaCl-Lösung) 15 Min. lang erhitzt wurde, und zwar auf Temperaturen variierend von 45—80° C. Davon wurden 2—3 Wochen hindurch täglich 2 Injektionen von 2—3 ccm gegeben, womit also pro Tag mehr als 300—500 mg erwärmten Virus injiziert wurden. Nach dem Jahre 1908 wurde die Behandlung geändert die bei 80°, 75° und 70° erwärmten Emulsionen wurden weggelassen, die Erwärmung verkürzt, und die Konzentration der Emulsionen auf 1 : 100 zurückgebracht. Bei dieser Behandlung (Dauer 10—14 Tage) wurden pro Tag durchschnittlich 30—40 mg des erwärmten Virus gegeben. Nach dieser Aenderung sind keine Lähmungen mehr aufgetreten.

Wenn diese von Puscariu verwendeten Emulsionen wirklich abgetötetes Virus enthalten haben, so würde der Umstand, daß sie bei den Patienten Lähmungen verursachten, in der Tat ein wichtiges Argument gegen die Virus fixe-Theorie bilden.

Aus welchem Grunde nimmt man aber an, daß die erhitzten Emulsionen aus abgetötetem Virus bestanden haben? Es ist doch bekannt, daß Virus fixe-Emulsionen viel länger als 15 Min. Temperaturen von 45—60° ausgesetzt werden müssen, um völlig abgetötet zu werden. Prausnitz und Lubinsky führen in der vor kurzem in Weichhardts Ergebnissen Bd. 8. 1927 erschienenen Abhandlung über Lyssa auf S. 49 eine Tabelle an, die unter anderem angibt, daß das Virus fixe eine Temperatur von 45° C 24 Std., eine von 50° 1 Std. und 52—58° noch eine halbe Stunde überleben kann. Meine eigenen, in dieser Richtung angestellten Versuche haben folgende Resultate ergeben:

Unser Virus fixe (mit einer m. l. d. von 0,0025) mg wurde 1:10 verdünnt, durch doppelte Gaze filtriert, in Mengen von 10 cem in gewöhnliche Reagensröhrchen von 15 mm Durchmesser verteilt, darauf auf 50° bzw. 60° oder 65° C 15 Minuten lang erhitzt und sofort abgekühlt.

Wurden gleich nachher von den erhitzten Emulsionen weitere Verdünnungen gemacht und Meerschweinchen intrazerebral injiziert, so zeigten sie sich in folgenden Konzentrationen noch wirksam:

Vom V. f. erwärmt auf	65° C :	$\frac{1}{8}$ cem von 1:100	= 1,25 mg
Vom „ „ „	60° C :	$\frac{1}{8}$ cem von 1:250	= 0,50 mg
Vom „ „ „	50° C :	$\frac{1}{8}$ cem von 1:5000	= 0,025 mg

Durch die 15 Min. dauernde Erwärmung auf 65° C war also das Virus 500mal, bei 60° 200mal und bei 50° 10mal in seiner Wirksamkeit zurückgegangen.

Ging man von einer Emulsion von 1:20 aus, dann war nach dem Erhitzen auf 65° noch tödlich $\frac{1}{8}$ cem von 1:40 (= 3 mg) und nach einer solchen auf 50° $\frac{1}{8}$ cem von 1:1000 (= 12,5 mg), so daß das Virus auf $\frac{1}{1000}$ resp. $\frac{1}{50}$ seiner ursprünglichen Wirksamkeit zurückgebracht war.

Daraus folgt, daß von den 8 Emulsionen Puscarius sicher 5 aus noch lebendem Virus bestanden haben müssen. Aus dem Obenstehenden kann man ferner berechnen, daß eine Injektion von:

500 mg V. f. von	65° C	entspricht	1 mg	frischen Virus
500 „ „ „	60° C	„	2,5 mg	„ „
500 „ „ „	50° C	„	50 „	„ „

und daß die 5 aufeinanderfolgenden Injektionen von Virus von 65°, 60°, 55°, 50° und 45° (total 2500 mg erhitztes Virus) ohne Zweifel eine Menge von 150 mg und sogar noch mehr des frischen Virus repräsentierten. Davon wurden je nach der Schwere des Falles 2—4 Injektionsserien gemacht. Wie ich bereits in einer früheren Arbeit¹⁾ mitgeteilt habe, sind in unserem Institute beinahe alle Paralysen aufgetreten bei einer Behandlung, die auf einer Dosierung von mehr als 300 mg Virus fixe in 3 Wochen basierte. Es kann uns also gar nicht wundern, daß Puscariu sie mit seiner Methode aus der Zeit vor 1908, die, wie oben erwähnt, einer Dosierung von mindestens 300—600 mg des virulenten Virus innerhalb 2—3 Wochen äquivalent ist, wiederholt gesehen hat.

Es wird aber sogleich begreiflich, warum bei ihm nach dem Jahre 1908 keine Lähmungen mehr aufgetreten sind, trotzdem die auf 80°, 75° und 70° erwärmten Emulsionen (die am wenigsten schädlichen!) weggelassen wurden und selbst trotzdem die Erhitzung der übrigen Emulsionen verkürzt wurde, so daß sie etwas virulenter wurden. Außerdem jedoch, und darauf kommt es hauptsächlich an, wurde nach 1908 die Dosis mindestens auf den 10. Teil der ursprünglichen zurückgebracht. Bei den schwersten Fällen wurden nicht mehr als 500 mg des erwärmten Virus in einem Zeitraum von 14 Tagen gegeben, welche Menge noch nicht 100 mg frischen Virus gleichzustellen war. Mit dieser Methode hätten auch wir mit unserem Virus keine Paralysen befürchtet.

Bei dieser Gelegenheit kann ich sogleich mitteilen, daß seit dem Jahre 1923, wo wir die Behandlung der Europäer in der Weise abgeschwächt haben, daß bei keinem der Schemata in 3 Wochen eine Totalmenge von 300 mg Virus überschritten wird bis heute, also in einem Zeitraum von 5 Jahren, keine Paralysen mehr aufgetreten sind. In dieser Zeit wurden nach dieser schwächeren (Verdünnungs-) Methode 487 Europäer behandelt. Außerdem wurden in derselben Periode noch 456 Europäer nach der Br.-Indischen Methode, d. i. mit

1) Ztschr. f. Hyp. Bd. 106. 1926. S. 151.

durch Karbol völlig abgetötetem Virus fixe behandelt. Auch unter diesen sind keine Lähmungen aufgetreten.

Unsere Paralysestatistik zeigt folgendes Bild:

	Frisches Virus				1923	1927
	1906 und 1907	1908 und 1909	1910 bis Juli 1912	Juli 1912 bis Ende 1922	frisches Virus	mit Karbol abgetötetes Virus
Behandl. I	35 mg V. f.	35 mg V. f.	92 mg V. f.	92 mg V. f.	72 mg V. f.	280 mg V. f.
„ II	72 „ „ „	74 „ „ „	322 „ „ „	210 „ „ „	160 „ „ „	
„ III	164 „ „ „	263 „ „ „	768 „ „ „	395 „ „ „	212 „ „ „	
„ IV	198 „ „ „	965 „ „ „	1315 „ „ „	605 „ „ „		
Anzahl behandelten Eur.	212	305	434	2421	487	456
Anzahl von Lähmungen	—	—	5	4	—	—

Die bis jetzt erzielten Resultate sprechen also für die Richtigkeit unserer Annahme, daß die Dosierung des lebenden Virus fixe auf das Entstehen von Lähmungen von großem Einfluß ist.

Zur näheren Erklärung des früher Gesagten will ich noch besonders darauf hinweisen, daß ich mit meiner Behauptung, eine Dosierung von mehr als 300 mg Virus fixe in 3 Wochen könne gefährlich werden, nicht sagen will, daß diese Menge völlig injiziert sein muß, um schädlich sein zu können. Diese Dosierung zeigt nur an, daß die aufeinanderfolgenden Dosen bei diesem Schema zu rasch steigen. Vor allem sollen in der 1. Woche die Dosen nicht zu groß sein. Unsere Fälle weisen darauf hin, daß, falls in der 1. Woche eine Totalmenge von 100 mg Virus injiziert wird, schon im Laufe der 2. Woche, also vor Ablauf der Behandlung, Lähmungen auftreten können. Auch in der 2. Woche darf diese Menge bei unseren europäischen Patienten nicht überschritten werden (Lähmungen in der 3. Woche). Meiner Ansicht nach ist eine Behandlung mit anfangs vorsichtig steigenden Dosen weniger gefährlich als eine, wobei täglich dieselben Mengen gegeben werden. So ist z. B. ein Behandlungsschema, das bei täglich steigenden Dosen in der 1. Woche 35 mg, 2. Woche 75 mg, 3. Woche 100 mg, Gesamtmenge 210 mg, 1. Injektion 0,5 mg, letzte 30 mg, unschädlicher und besser, als ein solches, wobei 21 Tage hindurch immer die gleiche Menge von 10 mg (Gesamtmenge auch 210 mg) injiziert wird. Bei dieser letzten Methode gibt man bei der 1. Injektion zuviel Virus (Gefahr für Paralyse) und bei der letzten zu wenig (geringer immunisatorischer Effekt), weshalb sie in jeder Hinsicht abzulehnen ist.

Nachdruck verboten.

Entgegnung zu dem Artikel von Dr. Otto Herrmann „Ueber einmalige obligatorische Schutzimpfung der Hunde gegen Tollwut“.

Von **H. Mießner** und **G. Baars**.

Herrmann bespricht in seinem Artikel¹⁾ die Ergebnisse unserer im Jahre 1926 in gleicher Zeitschrift. Bd. 101. S. 79 veröffentlichten Versuche der prä-infektionellen Immunisierung an Hunden. Herrmann wendet sich gegen die von uns in der Schlußbetrachtung geäußerte Ansicht, daß sich nunmehr weitere Laboratoriumsversuche erübrigen, und daß nur die Praxis über die Brauchbarkeit der Impfung als Mittel zur Bekämpfung der Tollwut entscheiden kann. Um seinen gegnerischen Standpunkt zu erläutern, greift Herrmann zunächst den von uns für die Kontrollinfektion gewählten intramuskulären Weg an und verlangt für die Prüfung auf Immunität den subduralen Infektionsmodus. Es ist allgemein bekannt, daß die subdurale Tollwutinfektion in fast 100 Proz. zur Erkrankung an Tollwut führt, während bei der intramuskulären Infektion nur ein Teil der Infizierten erkrankt. Das gilt sowohl für Versuche im Laboratorium wie auch für die natürliche Infektion durch den Biß tollwütiger Hunde, denn nicht alle Menschen und Tiere, die von tollwütigen Hunden gebissen werden, erkranken an Tollwut.

Nach Marx und Jos. Koch, zit. nach Pokschischewsky²⁾ ist die intramuskuläre Infektion in die Muskulatur zu beiden Seiten der Wirbelsäule mit etwa 95 Proz. Erfolgen der subduralen Infektion fast gleichwertig.

Pokschischewsky, der seine Immunisierungsversuche an Hunden in der Wutschutzabteilung des „Robert Koch“-Instituts anstellte, schreibt, und sein Standpunkt deckt sich mit unserer Auffassung: „Bei der intramuskulären Infektion ist es nicht gleichgültig, in welche Körperteile die Infektion erfolgt. So ist die intramuskuläre Einspritzung von Virus fixe in die Extremitätenmuskulatur des Kaninchens nach den Erfahrungen Jos. Kochs in einer Reihe von Fällen ohne jeden Erfolg, während die gleiche Dosis in die dicke Lendenmuskulatur zu beiden Seiten der Wirbelsäule eingespritzt, fast ausnahmslos tödlich wirkt.“ „Die von uns bevorzugte intramuskuläre Infektion nähert sich mehr den Bedingungen der natürlichen Erkrankungsweise und hat deshalb auch praktische Bedeutung. Allerdings kann man nur dann von einer idealen Immunität reden, bei der die Tiere auch gegen die subdurale Infektion sich refraktär erweisen. Für die Praxis würde allerdings schon Immunität genügen, bei der die Versuchstiere eine auf intramuskulärem Wege erfolgende Straßenwutinfektion überstehen oder die natürliche öftere Infektion durch den Biß tollwutkranker Hunde.“

Es kommt die intramuskuläre Laboratoriumsinfektion der natürlichen Infektion am nächsten. Wozu soll man also die den natürlichen Verhältnissen widersprechende subdurale Infektion wählen? Daß gegen die intramuskuläre Infektion nach einmaliger subkutaner Impfung mit 0,33 g Trockenimpfstoff „Lyssin“ = 0,9 g frischem Virus fixe tatsächlich Immunität erzielt wird, wird durch die große Zahl unserer Versuche einwandfrei erhärtet. Von 120

1) Herrmann, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 107. 1928. S. 84.

2) Pokschischewsky, Ueber Methoden der Schutzimpfung gegen Tollwut. (Zeitschrift f. Hyg. Bd. 76. 1914. S. 453.

mit Lyssin geimpften und 4 Wochen später intramuskulär infizierten Hunden erkrankten infolge der Infektion 2 an Tollwut, während von den gleichzeitig in gleicher Weise infizierten 36 Kontrollhunden und 24 Kontrollkaninchen 24 Hunde und 22 Kaninchen an Wut verendeten. Durch unsere umfangreichen und für das Laboratorium mit viel Mühe verknüpften Versuche dürfte zur Genüge die Ungefährlichkeit und Wirksamkeit unserer Impfmethode dargelegt sein. Aus diesem Grunde haben wir mit der Veröffentlichung unserer Versuchsprotokolle die Meinung vertreten, daß weitere Laboratoriumsversuche (nach der von uns geübten Methode natürlich!) sich erübrigen, da sie kaum andere Ergebnisse liefern werden.

Herrmann schreibt weiter: „Daß überhaupt der Infektionsmodus und zugleich das Straßenvirus, welches dabei verwendet wurde, recht schwach war, zeigt uns noch der Umstand, daß ein bedeutender Teil der Kontrolltiere nach äußerst langer Inkubationszeit an Wut zugrunde gingen (in den Versuchsreihen 7, 8, 9, 12, 13, 15, 16, 18 und 21 starben Kontrollhunde nach 52 bis 158 und Kontrollkaninchen nach 49—181 Tagen an Wut), wogegen nach schweren Bißwunden unter natürlichen Verhältnissen Hunde oft schon 2 bis 3 Wochen nach dem Biß tollwütig werden.“

Es dürfte doch Herrmann nicht unbekannt sein, daß unter natürlichen Verhältnissen ebenfalls längere Inkubationszeiten beobachtet werden. Auch entwirft er mit dieser Darstellung ein ganz falsches Bild von dem Verlauf unserer Kontrollinfektionsversuche. Das von uns zur Infektion benutzte Straßenvirus stammte aus frisch eingesandtem Untersuchungsmaterial von tollwütigen Hunden aus dem Lande. Es kamen die verschiedensten Straßenvirusstämme ohne vorherige Kaninchenpassage zur Verwendung. Also auch in dieser Beziehung entsprechen unsere Versuchsbedingungen weitgehendst den natürlichen Verhältnissen. Von 81 Kontrollhunden verendeten 55 an Tollwut, und zwar 42 Hunde 10—23 Tage post infectionem, 10 Hunde 34—60 Tage p. inf., 3 Hunde 112—158 Tage p. inf. So sehen die Zahlen in Wirklichkeit aus. Von 41 Kontrollkaninchen verendeten 39 an Tollwut, und zwar 33 Kaninchen 14—30 Tage p. inf. und 6 Kaninchen 33—81 Tage p. inf. Folgende Tabelle erläutert die Verteilung der Kontrollinfektionsversuche auf die einzelnen Versuchsreihen. Die von Herrmann angezogenen Versuchsreihen sind durch Fettdruck besonders hervorgehoben.

Die Behauptung Herrmanns, daß das von uns verwendete Straßenvirus „recht schwach“ war, ist damit wohl widerlegt, desgleichen seine Schlußfolgerung, um die von uns „geimpften Tiere zu retten, müßte eine ganz geringe Immunität derselben genügen, da dabei doch kein einziger Hund sehr schwer verletzt wurde“.

Es mutet eigentümlich an, wenn Herrmann ohne Rücksicht auf die Ziele, die wir mit unseren, in drei Hauptgruppen eingeteilten Versuchen verfolgten, Sammelzahlen aufstellt, die dann ein ungünstigeres Ergebnis liefern, als dem Tatsächlichen entspricht. Unsere ersten Versuche an 53 Hunden mit frischem Virus fixe galten vornehmlich der Feststellung der verträglichen Virus fixe-Dosis. Dabei wurden in den ersten beiden Versuchsreihen ein Virus fixe-Stamm (B. I.) benutzt, der sehr schwach virulent war, wie auch aus unserem Protokoll hervorgeht und der daher nicht weiter verwendet wurde. Es ist also nicht mehr als recht und billig, wenn die in diesen beiden Versuchen aufgetretenen drei Fälle von Tollwut nach der Kontrollinfektion infolge ungenügender Immunität für sich betrachtet werden, da sie mit der von uns ausgearbeiteten Lyssinimpfmethode nichts zu tun haben. Ganz ähnlich liegen die Verhältnisse bei den von Herrmann angeführten Zahlen über das Auftreten von Impftollwut in unseren Versuchen. Er schreibt, „daß von 213 geimpften Hunden

Tabelle I.

Uebersicht über den Ausfall der Kontrollinfektionen bei Hunden und Kaninchen.

Ver- suchs- reihe	Zahl der in- fizierten Kon- trollhunde	Zahl der an Wut ver- endeten Kon- trollhunde	Wieviel Tage nach der Infektion	Zahl der in- fizierten Kon- trollkanin- chen	Zahl der an Wut verende- ten Kontroll- kaninchen	Wieviel Tage nach der Infektion
1a	2	2	21—23	1	1	21
1b	3	2	12—21	—	—	
2	4	4	10—21	—	—	
3	2	2	13—17	—	—	
4	2	2	13—14	—	—	
5	2	2	14—19	—	—	
6	2	2	18	—	—	
7	2	2	34—112	2	2	28—63
8	4	3	34—112	2	2	30—67
9	4	1	55	2	2	20—49
10	2	—	—	1	1	20
11	3	1	21	2	2	29—33
12a	2	—	.	2	1	25
12b	(4)	(3)	17—52	(2)	(2)	16—25
13	4	3	17—52	2	2	16—25
14	3	2	17	2	2	19—25
15	2	2	14—158	2	2	19—21
16	3	2	15—17	2	2	24—65
17	3	3	19—22	2	2	17—18
18	4	3	17—52	2	2	16—21
19	3	3	15—19	2	2	14—16
20	3	2	13—16	2	2	21—25
21	3	1	60	1	1	81
22	3	2	15—23	2	2	15—23
23	3	2	13—16	2	2	16—30
24	3	—	.	2	1	21
25	3	2	14—53	2	2	17—18
26	3	2	14—53	2	2	17—18
	81	55		41	39	

Die fett gedruckten Versuchsreihen sind die von Herrmann als solche mit besonders langen Inkubationszeiten genannten.

7 Tiere an Impflyssa zugrunde gingen“. Das stimmt, und doch ist es eine unsachliche Wiedergabe, wenn dabei unsere Versuchseinteilung unberücksichtigt bleibt, denn die Zahl 7 setzt sich zusammen aus 4 von 53 Hunden, die in den Versuchen zwecks Feststellung der verträglichen Virus fixe-Dosis mit großen Dosen Virus fixe geimpft wurden, aus 1 von 40 Hunden, die nach der japanischen Impfmethode „Umeno und Doi“ geimpft waren und aus 2 von 20 Hunden, die mit größeren Dosen (1,5 und 2,5 g Virus fixe-Lyssen) immunisiert waren. Nach der von uns angegebenen Impfmethode ist aber **kein** Hund an Impflyssa erkrankt. Diese Tatsache wird auch dadurch nicht erschüttert, wenn Herrmann unter den 19 interkurrenten Todesfällen von 213 Impflingen noch Impflyssafälle vermutet. Die nötige Erfahrung und Objektivität in der Beurteilung unserer Versuche darf er uns schon zutrauen. Es ist nicht leicht, eine solch große Zahl von Hunden, wie wir sie in den Versuchen verwandten, in beschränkten Laboratoriumsstallungen monatelang zu halten. Beißereien sind an der Tagesordnung, Staupeepidemien nicht selten. Wenn von 81 Kontrollhunden keiner interkurrent verendete, so ist das sehr erklärlich durch die Unterbringung dieser Hunde in Einzelkäfigen und die meist durch ihren Wuttod abgekürzte Beobachtungszeit. Wir können nur auf die Versuchsprotokolle

verweisen. Daraus wird jeder sachliche Kritiker entnehmen können, daß die Vermutung Herrmanns, „die Zahl der an Impfwut oder post infection. Wut oder wenigstens infolge dieser Behandlung gestorbenen Hunde bedeutend höher anzurechnen“ sei, als voreingenommen und unberechtigt zurückgewiesen werden muß.

Wenn Herrmann Zweifel hegt, so stand es ihm frei, vor seiner Entgegnung gleichgerichtete Versuche an Hunden anzustellen, die er selbst für nötig erachtet. Seine Entschuldigung, vorläufig keine Möglichkeit zu haben, mit genügender Zahl von Hunden zu experimentieren, verliert an Stichhaltigkeit, da er auf die große Zahl von Hunden in Sowjet-Rußland hinweist, die er mit „vielen Millionen (bei ca. 140 Millionen Menschen)“ angibt und er gleichzeitig Immunisierungsversuche entsprechend unserer Impfmethode an 10 Hunden durch subkutane Impfung mit 0,9 g frischem Virus fixe anstellte. Die Immunisierungsversuche an den 10 Hunden hatten nun das Ergebnis, wie es nach unseren Angaben nicht anders zu erwarten war: Es erkrankte kein Hund an Tollwut. Dabei muß man berücksichtigen, daß Herrmann ein anderes als das von uns benutzte Virus fixe für die Immunisierung verwandte, und es ist doch bekannt, daß zwischen den einzelnen Virus fixe-Stämmen, wie sie von den Tollwutimpfstationen der verschiedenen Länder benutzt werden, große Unterschiede bezüglich der Virulenz und auch ihrer sonstigen Eigenschaften bestehen. Auch wurde von Herrmann frisches Virus fixe und nicht Lyssin als Impfstoff verwendet. Ohne diese Tatsachen in Rücksicht zu ziehen, hat also Herrmann durch Versuche an 10 Hunden die Unschädlichkeit der subkutanen Einspritzung von 0,9 g Virus fixe ohne Rücksicht auf die Größe des Hundes (der kleinste Hund wog 12 Pfund) bestätigt. Herrmann will allerdings seine Impfversuche an den 10 Hunden gerade gegenteilig beurteilt wissen, da 2 Hunde nach 6 Tagen „erkrankten“. Der eine Hund „nahm sehr wenig Futter zu sich und sah sehr elend aus. An beiden Augen bestand Konjunktivitis. Temperatur 40,2°. Gewicht bis 6750 g. Am 7. Tage war ein Auge vom Eiter ganz zugeklebt. Temperatur 39,9°. Am 8. Tage Temperatur 39,6°. Allgemeiner Zustand etwas besser. Beide Augen waren wieder offen, aber sehr eitrig. Vom 9. Tage an allmähliche Besserung und endlich völlige Genesung. Vom 12. Tage nach der Impfung, also 6 Tage nach der Erkrankung, war die Temperatur schon wieder normal (38,6°); es war aber ein Gewichtsverlust von 550 g im Vergleich zum 6. Tage zu verzeichnen. Auch nach einem Monat wurde das frühere Gewicht noch nicht erreicht (6450 g). Der zweite Hund, bei welchem ebenfalls allgemeines krankes Aussehen, Inappetenz, Konjunktivitis und Temperatursteigerung (am 6. Tage 39,6°) beobachtet wurde, erholte sich schon wieder in etlichen Tagen, das Gewicht aber fiel auf bedeutende Zeit: am 6. Tage bis 6040 g, am 12. bis 5800 g, am 18. bis 5400 g und sogar einen Monat nach der Impfung war das ursprüngliche Gewicht noch nicht erreicht (5520 g).“

Daraus schließt Herrmann: „0,9 g des frischen fixierten Virus, welches von Mießner und Baars als gefahrlos angesprochen wird, löste somit bei 2 von 10 Hunden Krankheitserscheinungen aus (es war ca. 0,15 g auf ein Körpergewicht von 1000 g, also ebenfalls wie bei Kaninchen und Meerschweinchen). Bei größeren Partien der Impflinge könnte diese Dosis vielleicht noch weit schwerere Folgen nach sich ziehen.“

Wie aus den kurzen Krankengeschichten hervorgeht, waren anscheinend beide Hunde an leichter Staupe erkrankt. Jedenfalls hat das geschilderte Krankheitsbild nichts mit Tollwut zu tun, und darauf kommt es hier an.

Abgesehen von den zahlreichen Versuchen im Laboratorium, verfügen wir über mehrere hundert Hunde, die unter praktischen Verhältnissen gegen Toll-

wut geimpft wurden, ohne daß auch nur bei einem Hunde Impftollwut entstanden wäre.

Weiter bleibt unverständlich, weshalb Herrmann diese Hunde nicht auf Immunität gegen Tollwut durch Infektion mit Straßenvirus nachgeprüft hat. Die Infektionsversuche nach der Impfung lagen doch ganz in der Richtung unserer Versuche und hätten die Grundlage zu einer Entgegnung gegeben, die so gegenstandslos ist.

Herrmann hat unter anderem 8 Kaninchen und 12 Meerschweinchen 0,02—1,2 g frisches Virus fixe (Kasan) einmal subkutan eingespritzt und dadurch bei einem Kaninchen und 7 Meerschweinchen Tollwut erzeugt. Aus diesen Versuchen schließt er, daß „die Angabe von Mießner und Baars, daß 0,9 g des frischen Virus fixe für alle Hunde, ungeachtet deren Größe, nicht gefährlich ist, wohl nicht aufrecht erhalten werden“ kann. Auf welche experimentellen Grundlagen stützt sich Herrmann bei seiner Feststellung, daß „das Kaninchen für Lyssaversuche an Hunden ein vollwertiges Kontrolltier“ ist? Andere und wir haben jedenfalls die Beobachtung gemacht, daß Kaninchen sowohl wie Meerschweinchen und Mäuse empfänglicher für die künstliche Wutinfektion sind als Hunde. Wir müssen es daher ablehnen, Ergebnisse aus Versuchen an Kaninchen, Meerschweinchen und Mäusen ohne weiteres auf Hunde zu übertragen und können Herrmann in der Erläuterung seiner Versuche nicht folgen. Die Versuche an den 10 Hunden konnten Herrmann eines besseren belehren. Wie abwegig das Vorgehen Herrmanns ist, erhellt des weiteren aus einem Satze in seiner Besprechung unserer Versuchsergebnisse, die sich — wohl verstanden — auf die Bestimmung der verträglichen Lyssindosis für Hunde bezogen und auf die Herrmann ein Allgemeinurteil über unsere Impfmethode aufbaut:

„Da Mießner und Baars zur einmaligen Impfung ihr Lyssin, ein getrocknetes, aber virulentes Mark, empfehlen, welches in den Versuchen dieser Forscher unter 120 Hunden 2mal Impflyssa (nach 1,5 und 2,5 g, also noch Impfdosen, welche verhältnismäßig nicht viel mehr als deren Grenzdosis von 1,0 g ausmachen) ausgelöst hat, so kann man auch dieses Verfahren nicht als ungefährlich betrachten. Daß es dabei bei einmaliger Impfung auch keinen genügenden Schutz leistet, habe ich schon oben gezeigt.“

Zunächst muß es statt 120 Hunden 20 Hunde, statt Grenzdosis von 1,0 g 0,9 g heißen. In den zitierten Versuchen wurden 20 Hunde in 2 Versuchsreihen (Versuchsreihe 15 und 16) mit Lyssindosen geimpft, die 0,45—2,5 g frischem Virus fixe entsprachen. Es erkrankten darauf 2 Hunde, die die größten Impfdosen von 1,5 g und 2,5 g Virus erhalten hatten, an Impftollwut, ein Ergebnis, das uns unter anderem, wie deutlich aus unserer Veröffentlichung hervorgeht, veranlaßte, die Impfdosis auf 0,9 g frisches Virus fixe herabzusetzen. Bei einer Dosis von 0,33 g Lyssin = 0,9 g frisches Virus fixe ereignete sich ohne Unterschied der Größe des Hundes kein Fall von Impftollwut, und das hat Herrmann in seinen Versuchen an 10 Hunden zwar anscheinend unbeabsichtigt ebenfalls bestätigt. Die Bemerkung Herrmanns, daß die Dosen von 1,5 g und 2,5 g „verhältnismäßig nicht viel mehr als die Grenzdosis“ ausmachen, wäre auch wohl besser unterblieben, da sie ein mehrfaches der von uns angegebenen Impfdosis von 0,9 g darstellt.

Es liegt uns fern, wie wir das auch bei der Veröffentlichung unserer Versuchsergebnisse im Jahre 1926 zum Ausdruck gebracht haben, der obligatorischen Impfung der Hunde gegen Tollwut das Wort zu reden. Wir wollen vielmehr eine solche Maßnahme nur von der Not diktiert wissen, die in Deutschland zu gewissen Zeiten in Grenzdistrikten vorlag. Die Handhabe für eine solche Notlage geschaffen zu haben, betrachten wir als die Frucht unserer Arbeit.

Nachdruck verboten.

Zur Frage der Immunität bei Piroplasmosen des Rindes.

[Aus der Protozoologischen Abteilung des Veterinär-Bakteriologischen Instituts zu Leningrad (Petrograd) (Leiter der Abteilung Professor W. L. Yakimoff).]

Von Professor Dr. med. u. med.-vet. **W. L. Yakimoff.**

Im Jahre 1796 hat Pease, der die Einschleppung des Texasfiebers in Pennsylvanien studierte, darauf hingewiesen, daß Vieh, welches diese Krankheit in die Nordischen Staaten einschleppte, selbst gesund blieb. Diese Tatsache ist nur dem Umstande zuzuschreiben, daß es nach vorher überstandener Krankheit immun blieb.

Die Immunität bei Rinderpiroplasmosen, welche durch Parasiten aus den Subgattungen *Piroplasma* und *Babesiella* hervorgerufen werden, hat einen nicht sterilen („immunitas sterilisans“) Charakter, sondern den der labilen Infektion („Immunitas non sterilisans“) oder der „Praemunitio“ nach Ed. Sergent und seinen Mitarbeitern. Sie basiert darauf, daß bei der Genesung (gleichgültig, ob nach spontaner oder nach Behandlung mit chemotherapeutischen Präparaten) die Parasiten aus dem Blute nicht gänzlich verschwinden, sondern im Organismus bleiben. Wie lange sie sich dort nach dem Verschwinden aller Krankheitssymptome aufhalten können, beweisen die Beobachtungen von Kossel, Weber, Schütz und Miessner: das Blut, welches von einem Tiere am 531. Tage nach der Genesung von der Piroplasmose (*Babesiella bovis*) entnommen wurde, infizierte ein gesundes Tier, obgleich beim Mikroskopieren keine Parasiten konstatiert werden konnten.

Nach Ed. Sergent und seinen Mitarbeitern gibt das ungefähr 3 Monate nach überstandener Krankheit entnommene Blut nach Einführung in gesunde Tiere eine starke Reaktion, nach 8 eine mittelstarke, nach 20 aber keine Reaktion.

Theiler beschreibt einen Fall, wo das Blut 7 Jahre virulent war; in den Vereinigten Staaten wurde ein gleiches Resultat mit dem Blute eines Tieres erzielt, welches vor 12 Jahren genes (Schröder).

Nach Lignières ist dauernder latenter Parasitismus Beding einer starken Immunisation. Erfolgt beim Abschwächen desselben ein neues, unbedeutendes Eindringen der Piroplasmen, so wird die Immunität wieder hergestellt. Das Einführen von Blut in solche Tiere ist manchmal resultatslos.

Junge Tiere übertragen bekanntlich die Krankheit leichter und haben sogar manchmal keinen blutigen Urin. Solche Tiere werden immun und sollen, falls sie späterhin an Piroplasmose erkranken, die Krankheit leicht überstehen. Tiere unter 1 Jahre, welche eine subkutane Injektion von virulentem Blute gut übertragen, werden nur dann fest und dauerhaft immun, wenn sie eine schwere Form durchmachen. Bei dem größten Teil dieser Tiere ist die Immunität nicht genügend stark und nur vorübergehend, so daß sie eingehen oder nach 1 Jahre die Krankheit schwer überstehen, sei es durch natürliche oder unnatürliche Infektion.

Somit verleiht die erste Erkrankung eine Immunität. Ed. Sergent und seine Mitarbeiter beobachteten, daß bei „prämunisierten“ Tieren Reinokulation mit *Piroplasma bigeminum* von keinen Erscheinungen begleitet wird. Einige Tiere weisen aber im Blute Parasiten auf bei gleichzeitiger Temperatursteigerung oder ohne solche. Der Grad derselben ist, wie wir sahen, verschieden und abhängig von der Schwere der Krankheit. Eine solide Immunität entsteht nach

schwerer Krankheit. Nach Nocard vermindert eine schwache Form nur die Empfindlichkeit und die letztere verschwindet nach einigen Rezidiven. Wiederholten Impfungen ist die Standhaftigkeit von Tieren zuzuschreiben, welche am Krankheitsherde geboren und aufgewachsen sind. Nach Th. Smith und Kilborne verleiht schwere oder einige leichte Erkrankungen eine bemerkliche Immunität, wogegen eine leichte Erkrankung das Tier nicht vor einer neuen Infektion oder vor dem Tode nach 1—2 Jahren schützt.

Man darf aber nicht glauben, daß eine einmal überstandene Krankheit das Tier von weiterer Ansteckung sicher schützt; diese Immunität ist eine begrenzte von unbestimmter Zeit. Theiler hat bewiesen, daß sie sich progressiv verkleinert, ungeachtet einer Reinfektion mit Hilfe von Zecken. Er glaubt, daß es sich hier nicht um ein Verschwinden der Immunität, sondern um eine gewöhnliche Verminderung derselben handelt, weil das Blut immer noch virulent bleibt. Solche Tiere mit verminderter Immunität sind der Ansteckung durch eine schwere Piroplasmose ausgesetzt. Gray führt einen sehr interessanten Fall an: Ein Farmer in Rhodesien führte in seine Meierei, wo im Laufe von 2—3 Jahren kein einziger Fall von Piroplasmose beobachtet worden war, neues Vieh ein; durch Zecken steckte sich Letzteres in sehr starker Form an und fiel sehr ab. Die am kranken Vieh lebenden Zecken gaben eine Nachkommenschaft, welche auf dem alten Vieh mit geringer Immunität auf diese eine starke Piroplasmose übertrugen.

Während unserer Arbeiten im Kampfe mit der Piroplasmose im Gouvernement Leningrad (Petrograd) im Jahre 1924 beschäftigten wir uns mit der Frage, wie lange diese Immunität anhalten kann. Wir zogen daher über jedes, an Piroplasmose kranke (*Babesiella bovis* Babes, 1888) Tier, welches wir in Behandlung bekamen, Erkundigungen ein, ob es nicht schon früher daran krank war. Von diesem Jahre bis 1926 hatten wir es mit 1886 an Babesielllose kranken Tieren zu tun und stellten fest, daß von dieser Zahl 1499 (79,4 Proz.) davon überhaupt nicht, aber 387 (20,5 Proz.) krank waren, und zwar

1mal	365 Tiere	(94,3 Proz.)
2mal	19 Tiere	(4 Proz.)
3mal	2 Tiere	(0,5 Proz.)
4mal	1 Tier	(0,2 Proz.)

Tabelle I.

Gesamtzahl der kranken Tiere	1924	1925	1926	Im ganzen
	285	828	773	1886
Waren nicht krank	223 (78,2 %)	681 (82,2 %)	595 (76,9 %)	1499 (79,4 %)
Waren krank im Jahre 1916	—	—	1	1
„ „ „ „ 1919	5	2	—	7
„ „ „ „ 1920	1	5	—	6
„ „ „ „ 1921	1	7	—	8
„ „ „ „ 1922	3	8	8	19
„ „ „ „ 1923	13	34	13	60
„ „ „ „ 1924	—	59	49	108
„ „ „ „ 1925	—	—	52	52
Unbekannt wann	39	32	55	124
	62 (21,7 %)	147 (17,7 %)	178 (23 %)	387 (20,5 %)
Waren krank 1 mal 60 (96,6 %)	134 (91,1 %)	171 (96 %)	365 (94,3 %)	
„ „ 2 „ 1 (1,6 %)	11 (7,4 %)	7 (3,9 %)	19 (4 %)	
„ „ 3 „ 1 (1,6 %)	1 (0,6 %)	—	2 (0,5 %)	
„ „ 4 „ —	1 (0,6 %)	—	1 (0,2 %)	
	13 (8,9 %)		22 (5,6 %)	

Dabei kamen manchmal Intervalle zwischen den einzelnen Erkrankungen von einigen Jahren vor, und zwar manchmal noch 2 und 3 Jahre später (Tab. I, S. 439).

Somit gibt weder eine 1mal, noch mehrmals überstandene Krankheit eine ein für allemal festgesetzte Immunität, ja diese kann sogar manchmal sehr rasch verschwinden. Wahrscheinlich besteht aber hier eine gewisse Gradation im Verschwinden der Immunität.

Im Jahre 1925 erwarben wir eine Kuh, welche früher die Babesiellrose überstanden hatte und spritzten im Sommer dieses Jahres ihr subkutan defibriniertes Blut mit *Babesiella bovis* ein (ziemlich starke Ansteckung der Erythrozyten). Eine Ansteckung erfolgte aber nicht und es fanden sich weder Parasiten im Blute, noch beobachtete man Steigen der Temperatur. In diesem und dem nächsten Sommer (1926) befand sie sich in 2 Herden, in denen viele Fälle von Babesiellrose zu verzeichnen waren. Ende April 1927 wurden der Kuh intravenös 100 ccm defibrinierten, ansteckungsfähigen Blutes eingespritzt, welches am 16. 3. von einer anderen Kuh genommen war und in der Kälte etwas über 2 Monate lang aufbewahrt wurde. Nach 2 Tagen (3. 5. wurde sie von neuem mit einem solchen Quantum Blut infiziert, aber subkutan, schon am selben Tage wurden in ihrem peripherischen Blute ringförmige *Babesiella bovis*, am nächsten Tage einzelne birnförmige, am nächstfolgenden nur ringförmige gefunden und am 4. Tage waren die Parasiten im Blute absolut verschwunden. Es war weder Hämoglobinurie, noch eine Temperaturerhöhung zu konstatieren. Puls und Atmung waren ohne Veränderung. Am 21. 5. wurde das Tier wieder infiziert (subkutan) mit 10 ccm desselben Blutes; das Tier hat sich nicht angesteckt. Die Kontrollkuh wurde am selben Tage (3. 5.) mit 100 ccm subkutan und 100 ccm desselben Blutes intravenös infiziert, worauf sich am 6. 5. im Blute Parasiten bei einer Temperatur von 40° zeigten und am 10. 5. sich bei ihr blutiger Urin zeigte (geheilt mit Arrhenal).

Fälle von Erkrankung von Kälbern beobachteten wir im Laufe von 2 und 3 Jahren hintereinander. In diesem Falle verleiht das Durchmachen der Krankheit im jugendlichen Alter keine Immunität für die nächstfolgende Zeit und No card hat vollkommen Recht, wenn er solche Fälle als „Illusionen über die beständige und volle Immunität“ bezeichnet.

Gibt es eine angeerbte Immunität? Lignières beobachtete sie nicht bei einem Kalbe, dessen Mutter eine bösartige Form der Krankheit durchgemacht hatte. Wir persönlich beobachteten folgende 2 Fälle:

1) ein Kalb, welches von einer Mutter geboren wurde, die die Krankheit durchgemacht hat, erkrankte an Babesiellrose 2mal (im nächsten und 3. Jahre). — 2) ein Kalb, welches von einer Mutter geboren wurde, die von Babesiellrose ausgeheilt worden war, erkrankte.

Übrigens kann man das Fehlen der Immunität bei Neugeborenen schon à priori voraussetzen, da festgestellt ist, daß das Blut des foetus niemals Piroplasmae enthält, obgleich bei Müttern mit schweren Formen Affektionen beobachtet werden, welche möglicherweise durch Intoxikation bedingt werden (eine rote Flüssigkeit im Nebenherzsäckchen, in der Brust und Bauchhöhle, weiche Nieren von dunkler Farbe, hyperaemische und lockere Leber, weinfarbige Flüssigkeit des Amnion).

Existiert nun gegen die Piroplasmose eine angeborene Immunität? Wahrscheinlich wohl.

In unserer Praxis hatten wir folgenden Fall:

In einem Gute („Sovkhos“ Kostromi des Bezirks Luga, Gouv. Leningrad), wo die Piroplasmose endemisch war, war aus den nicht piroplasmosischen Gegenden des Jaroslaver Gouv. eine Partie von 100 Tieren eingeführt. Im Laufe des Sommers erkrankten von ihnen 75 Tiere, die übrigen 25 aber nicht; wenigstens zeigten sie keine Krankheitssymptome.

Bemerkt sei noch, daß bei der Behandlung der Piroplasmose mit Trypanblau weiter beim behandelten Tiere Immunität auftritt. Bei der Wirkung dieses Präparates werden die Parasiten im Mikroskop unsichtbar, der Organismus aber sterilisiert sich nicht und die Parasiten können wieder im Blute erscheinen. Nuttall und Hadwen beobachteten sie nach 9—12 Tagen beim Hunde, nach 5—6 Tagen beim Ochsen, und Descazeaux sogar nach 10—20 Tagen beim Rinde. Bei uns selbst erschien manchmal nach der Behandlung mit Trypanblau und Ichthargan roter Urin (Tab. II).

Tabelle II.

Präparat	1923		1924		1925		1926		Im ganzen	
	Gesamtzahl der Behandelten	Zahl der Rezidiven	Gesamtzahl der Behandelten	Zahl der Rezidiven	Gesamtzahl der Behandelten	Zahl der Rezidiven	Gesamtzahl der Behandelten	Zahl der Rezidiven	Gesamtzahl der Behandelten	Zahl der Rezidiven
Trypanblau	59	11 (18,5 %)	330	5 (1,5 %)	—	—	—	—	389	16 (4,1 %)
Ichthargan	—	—	—	—	511	5 (0,9 %)	281	5 (1,7 %)	792	10 (1,2 %)
Im ganzen	59	11 (18,5 %)	330	5 (1,5 %)	511	5 (0,9 %)	281	5 (1,7 %)	1181	26 (2,2 %)

Diese Tabelle zeigt, daß nach der Behandlung mit chemotherapeutischen Präparaten wir Rezidive beobachtet haben:

nach Trypanblau 4,1 Proz.

und nach Ichthargan 1,2 Proz.

Wir beobachteten sie nach der Behandlung mit dem 1. Präparat nach 17—35, mit dem 2. Präparat aber nach 21—45 Tagen (Tab. III). Bemerkt sei noch, daß diese Rezidive für die Tiere keine Gefahr darstellten: der blutige Urin verschwand ohne Behandlung (nur manchmal gab man ihnen Inf. fol. Digitalis und Natr. sulfuric.) mehr oder weniger schnell und nur in 2 Fällen (nach Ichthargan) beobachteten wir einen Sterbefall.

Tabelle III.

Präparate	Gesamtzahl der Rezidive	Wieviel Tage nach Injektion													
		15	17	18	19	21	23	25	27	30	31	33	34	35	45
Trypanblau	11	—	1	1	1	—	1	1	1	1	1	1	1	1	—
Ichthargan	5	—	—	—	—	2	1	1	—	—	—	—	—	—	1

Nach Nuttall bleibt das Blut der mit Trypanblau behandelten Hunde im Laufe von 6—7 und sogar mehreren Monaten ansteckungsfähig und kann sogar die Krankheit in einer schweren Form hervorrufen, dann reagieren die Piroplasmen bei frisch infiziertem Tiere nicht mehr auf die Behandlung mit Trypanblau, d. h. es entsteht eine Resistenz diesem Präparate gegenüber. Jowett führte einem gesunden Hunde Blut eines mit Trypanblau behandelten Tieres ein, worauf sich eine typische Piroplasmose entwickelte, bei der die Anwendung von Trypanblau resultatlos war. Donatien und Lestoquard aber beobachteten diese Erscheinung nicht. Sie infizierten ein Kalb mit dem Blute eines anderen, welches vor 1½ Monaten von Piroplasmose durch Einführung von Trypanblau geheilt worden war. Nach 6 Tagen, als im Blute das Piroplasma bigeminum erschien, wurde ihm Trypanblau (0,2 g auf 100 Kilo Gewicht) eingespritzt, die Temperatur, welche anfangs stieg, fiel am nächsten Tage und die Parasiten, deren Zahl im Momente der Infektion 21 Proz betrug, belief sich nach 3 Std. nur noch auf 10 Proz.

Wie bereits oben gesagt, werden die an Piroplasmose-Kranken und mit Trypanblau behandelten Tiere immun. Die Hunde von Nuttall und Hadwen, welche mit diesem Präparat bearbeitet wurden, steckten sich bei Einführung des virulenten Blutes, welches von Hunden mit starker Piroplasmose entnommen war, nicht an. Jowett konnte erfolgreich einen von seinen behandelten Hunden nach 7 Monaten reinokulieren.

Diese Tatsache brachte Theiler auf den Gedanken der Immunisation gegen die Piroplasmose mit Hilfe von Trypanblau. Gegenwärtig ist die Immuni-

sation nach Theiler („Theilerisation“), welche darin besteht, daß das Tier, welches der Immunisation unterworfen ist, durch virulentes Blut angesteckt und nachher nach einigen Tagen mit Trypanblau behandelt wird, in Südafrika und Südamerika sehr verbreitet. 1926 und 1927 wurden im Gouv. Leningrad auf diese Weise mit Trypanblau 391 Tiere, mit Ichthargan 130 und mit Arrhenal 41 immunisiert (Tab. IV).

Tabelle IV.

Fräparate	1926			1927			Im ganzen		
	Gesamtzahl der Immuni- sierten	Hämoglobinurie		Gesamtzahl der Immuni- sierten	Hämoglobulinurie		Gesamtzahl der Immuni- sierten	Hämoglobulinurie	
		unter Immu- nisierten	unter In- immuni- sierten		unter Immu- nisierten	unter In- immuni- sierten		unter Immu- nisierten	unter In- immuni- sierten
Trypanblau	125	0		265	11		391	11	
Ichthargan	68	0		62	3		130	3	
Arrhenal	21	0		20	+ Ichth. = 2		41	2	
					4,6 %			2,8 %	
Im ganzen	215	0	von 596 Tieren 124 = 22,3 %	347		von 983 Tieren 111 = 11,3 %	562		von 1679 Tieren 235 = 13,9 %

Wir sehen von Tabelle IV, daß in beiden Jahren 2,8 Proz. der immunisierten Tiere (nach Theiler) die Hämoglobinurie, zwischen nicht immunisierten 13,9 Proz. hatten. Diese Hämoglobinurie der immunisierten Tiere ist aber nicht das Resultat der natürlichen Ansteckung, sondern es sind Rezidive nach künstlicher Infektion mit natürlichem Virus; diese Rezidive haben wir nicht behandelt, weil alle leichte Fälle sind.

Das Wesen der Immunität, welche durch Trypanblau erzeugt wird, besteht darin, daß dieses Präparat die Parasiten nicht definitiv tötet, sie aber dermaßen entkräftet, daß sie unvirulent für das betreffende Tier sind. Nach Nuttall wirkt das Präparat auf die Teilungsformen (amöbenartige) so, daß es deren weiteren Uebergang in die birnartigen Formen, welche als resultative Formen anzusehen sind, einstellt. Nuttall bewies durch direkte Zusammenzählung aller Formen (ring-, amöben- und birnförmiger), daß bei der Wirkung von Trypanblau der Prozentsatz der Birnformen sich mehr und mehr vermindert (infolge verringerten Ueberganges der Amöbenformen) und daß dann eine Verminderung der amöbenförmigen eintritt und ganz zuletzt im Blute nur noch ringförmige bleiben.

Dasselbe, was Nuttall für *Piroplasma bigeminum* von Südafrika beobachtet, fanden auch wir und Frl. Wassilewsky für denselben Parasiten des Nordkaukasus und für *Babesiella bovis* im Gouv. Leningrad, wie folgende Beobachtungen beweisen (Tab. V).

Wir ersehen daraus, daß im Blute nur ein kleines Quantum ringartiger Formen bleibt, durch die die Krankheit eine gutartige chronische Form annimmt, welche auf den Organismus des Tieres nicht schädlich wirkt. Die Parasiten selbst aber, obgleich in geringer Anzahl, befinden sich im Zustande einer Gegenwirkung gegen die neue Infektion.

Kann die mit Trypanblau (sowie auch mit anderen chemotherapeutischen Präparaten) erhaltene Immunität lange anhalten? Velu glaubt nicht, daß sie eine längere Dauer haben könne, als die Immunität

Tabelle V.

Tage der Krankheit	Prozent der Ansteckung der Erythrozyten	Birnenartige		Ringartige	Amöboartige	Präparat
		doppelt	einzeln			
		in %	in %			
1 Kuh						
1	7,5	52	16	6	26	Ichthargan 1,5
2	1,2	44	22	18	16	
3	sehr wenig	0	0	sehr wenig	sehr wenig	
4	"	0	0	"	0	
5	0	0	0	0	0	

Bemerkung: Angesteckt mit *Piroplasma bigeminum* (Pjatigorsk).

nach natürlich überstandener Krankheit. Ed. Sergent und seine Mitarbeiter konstatierten, daß die Präimmunisation bei einem Tiere 22 Monate dauerte, bei 2 anderen 15, beim 4., welches vor 14 Monaten infiziert wurde, zeigten sich nach der Reinokulation mit demselben Virus eine kurz dauernde Temperatursteigerung und Parasiten (4,5 Proz. d. Ansteckung) im Blute. Somit fiel beim letzterem die Immunität im Momente des Experiments. Außerdem haben wir, um den Grad der übertragenen Immunität festzustellen, 7 Tiere (4 Proz. d. Ansteckung), welche vor 5 und 6 Jahren immunisiert wurden, und 2 Kontrolltiere der Reinokulation in die Vene mit dem Blute und *Piroplasma bigeminum* unterworfen. Unter ersteren fand bei 1 eine 1tägige Temperatursteigerung (übrigens ist die Ursache derselben noch zweifelhaft), bei den übrigen 5 erschienen im Blute Parasiten, die von ihnen leicht überstanden wurden und die Tiere reagierten gar nicht. Die Versuchstiere dagegen erkrankten (Temperatursteigerung Parasiten im Blute). Dieselben Autoren fanden, daß bei *Babesiella berbera* die Immunität 1 Jahr 9 Monate anhält. Wir haben Vieh, welches wir uns im Jahre 1926 nach Theiler gegen *Babesiella bovis* immunisiert hatten, im nächsten (1927) Jahre ohne Immunisation gelassen, um uns zu überzeugen, ob unter ihnen Erkrankungen vorkommen. Das Resultat war folgendes (Tab. VI).

Tabelle VI.

Präparate	1926 waren immunisiert	1927
Trypanblau	126	} 12 (allen leicht)
Ichthargan	68	
Arrhenal	21	
Im ganzen	215	

Daraus ist zu schließen, daß die Immunität, welche bei der Chemoimmunisation entsteht, nicht länger als 1 Jahr andauert.

Wann tritt die Immunität ein? Nocard sagt, daß die Immunität, welche als Folge der 1. Erkrankung an Piroplasmose, erscheint, sich sehr langsam einstellt. Bei Tieren, welche durch das Blut von Tieren, die die Krankheit durchgemacht haben, immunisiert worden sind, tritt nach 8 Tagen das 1. Fieber ein, welches ungefähr bis 15 Tage anhält. Zwischen 25 und 30 Tagen tritt das 2. Fieber ein. Daraus kann man den Schluß ziehen, daß die Immunität nur nach dieser Zeit eintritt. Bestimmte Erfahrung hinsichtlich der Zeit des Eintretens der Immunität, wie des natürlichen Ueberstehens der Krankheit und auch nach der Immunisation fehlen. Vielleicht werfen die von uns ausgeführten Immunisationsexperimente doch ein gewisses Licht auf diese Frage.

Im Jahre 1925 infizierten wir mit natürlichem Virus von Färsen. Nach dem Erscheinen der Parasiten in ihrem Blute wurden sie zum 2., 3. und sogar 4. Male infiziert (Tab. VII).

Tabelle VII.

Nr.	Alter	Daten der ersten An- steckung	Erscheinen			Erste Wiederansteckung			Zweite Wiederansteckung		
			Parasiten im Blute	Steigen der Temperatur	Wann Trypanblau injiziert	Daten	Steigen der Temperatur	Parasiten im Blute	Daten	Steigen der Temperatur	Parasiten im Blute
1	1 Jahr 2 Mon.	19. 9.	23. 6.	23. 6.	23. 6.	12. 7.	15. 7. (nicht hoch)	15. 7. (sehr wenig)	12. 8.	0	(
2	1 „ 6 „	17. 6.	20. 6.	0	20. 6.	18. 7.	0	23. 7.	12. 8.	0)
3	1 „ 6 „	17. 6.	20. 6.	0	21. 6.	8. 7.		11. 7.			
4	1 „ 6 „	26. 6.	29. 6.	30. 6.	30. 6.	18. 7.					
5	1 „ 5 „	7. 6.	10. 6.	12. 6.	10. 6.	24. 7.					
6	1 „ 3 „	19. 6.	0	0	19. 6.	12. 7.			12. 8.	18. 7. (nicht hoch)	(

Aus dieser Tabelle ersehen wir, daß die Immunität schon nach einigen Tagen existiert und daß die Tiere nach der 1. Reinfektion nur durch eine leichte Erhöhung der Temperatur und durch das Erscheinen seltener Parasiten im Blute reagieren. Bei weiteren Reinfektionen wird aber auch dieses nicht beobachtet. Bemerkt sei noch, daß diese Tiere in den nächsten Jahren 1926 und 1927 in der Herde, wo Erkrankungen beobachtet wurden, sich nicht angesteckt haben.

Auf Grund des Materials, welches wir im Jahre 1926 bei der Immunisation nach Theiler erhalten hatten, traten wir der Lösung dieser Frage näher und beobachteten das Erscheinen getüpfelter Erythrozyten im Blute («géants pointillés» Lignières).

Alles oben besprochene gehört so zu sagen zu der spezifischen Immunisation, bei der ein Erreger der Krankheit vorhanden ist, gegen welchen man immunisiert. Bei der Piroplasmose gibt es aber noch eine Immunisation, bei welcher dieser Erreger nicht vorhanden ist. Zu ihr gehört die „Trypanblauinisation“, d. h. das Behandeln des Tieres, welches man gegen Piroplasmose zu immunisieren wünscht, nur mit Trypanblau ohne vorläufige Ansteckung. Man empfiehlt sie in denjenigen Fällen, wo in einer gewissen Herde die Erkrankung begonnen hat, worauf der ganzen Herde Trypanblau wird eingeführt werden. Der Sinn dieser Art der „Immunisation“ ist der, daß für die Zeit des Ausbruchs der Epizootie der Piroplasmose im Organismus des Tieres das spezifische Präparat zirkuliert, welches vor der Infektion schützt.

1925 bearbeiteten wir nach dieser Methode im Gouv. Leningrad (Kreis Lodeinoe Pole) gegen *Babesiella bovis* 492 Tiere; die Resultate waren verschieden, wiesen aber immer Erkrankungen unter den „immunisierten“ Tieren auf. Der Unterschied bestand nur in der Intensität der Erkrankung: 1) In Dörfern, wo die Babesiellöse noch im Anfang war (nicht mehr als 2—3 Jahre) erkrankten unter den „immunisierten“ 3 Proz., und unter den nicht immunisierten Tieren 27 Proz. — 2) In Dörfern mit „alter“ Babesiellöse (nicht unter 5—7 Jahren) erkrankten unter den „immunisierten“ 17 Proz., und unter den nicht immunisierten Tieren 21 Proz. Daraus ist zu ersehen, daß eine solche „Immunisation“ keine echte Immunität schafft, wie wir sie verstehen.

Praktisch hat eine solche „Immunisation“ gar keinen Wert.

Im Nordkaukasus interessierte man sich (einige sogar jetzt noch) für die

Anwendung zu Heilzwecken, so auch prophylaktisch von Mayers Reagens (Hydrargyr. bijodat. rubr. 2,27, Kali jodati 3,32 und Aq. destilat. 300,0).

Dieses „Präparat“ hat aber einen viel geringeren Wert, als die Trypanblau-nisation, wie wir uns 1927 überzeugten. Am 4. und 17. 6. dieses Jahres wurde es auf der Meierei in Perchalovka (Pjatigorsk) zu Beginn der Piroplasmose Epizootie (*Piroplasma bigeminum*) 42 Tieren von 63 (zu 5 ccm + 5 ccm Liq. Pearsoni) eingeführt. Am 7. 7. erwies sich bei einer allgemeinen Untersuchung des ganzen Viehes im Blute einer Kuh die Anwesenheit von *Piroplasma bigeminum*.

Daraus ist zu ersehen, daß solch eine „chemische Immunisation“ keinen praktischen Wert hat. Die durch solche Präparate geschaffene „Immunität“ ist nur für die verhältnismäßig kurze Zeit wirksam, solange das Präparat noch im Blute enthalten ist. Verschwindet dasselbe aus dem Blute, so ist der Organismus wieder der Infektion unterworfen.

Abgesehen von der natürlichen Abschwächung der Immunität existieren noch Ursachen, welche sie „abbrechen“. Zu diesen gehört vor allem die abermalige Infektion. M. Nicolle und Adil-Bey hatten ein Tier, welches vor 1 Jahre die Piroplasmose durchgemacht hatte und bei welchem Parasiten im Blute nach der Einführung von Pestvirus erschienen. Uteusch beobachtete das gleiche auf der Zurnabadschen Antipeststation Transkaukasus und sagt, daß es am längsten unter dem jungen örtlichen und nordkaukasischen Vieh beobachtet worden ist. Dasselbe beobachteten Memmo, Martoglio und Adani in der Erythraee, Jobling und Woobey auf den Philippinen, Kowalewsky in Turkestan und andere.

Es gibt sogar Beobachtungen, daß die Einführung des Pestvirus zum Tode des Tieres, welches man immunisieren will, führen kann (oder die Piroplasmose erscheint in Gegenden, wo man ihr Vorhandensein sogar nicht vermuten konnte). Nach Di Domizio ist der Ausbruch der *Piroplasma bigeminum*-Infektion der Depression durch das Pestvirus im Organismus des Tieres zuzuschreiben. Der Parasit, einmal erweckt, wird virulent und ansteckungsfähig mit allen Folgen, welche die Virulenz erzeugt. Im Gegenteil aber ist es nicht möglich, mit einem durch Pestinfektion erweckten Parasiten, das gegen die Pest immunisierte Vieh zu infizieren. Uteusch beobachtete, daß die durch piroplasmotisches Blut (in großer Anzahl) inokulierten 69 hochimmunen Ochsen, nicht angesteckte mit Piroplasmose infiziert wurden. Diese Tatsache beweist, daß eine Exaltation ungenügend ist, um die Resistenz, welche in langer Zeit durch die vererbte Immunität erworben wurde, zu unterdrücken; wahrscheinlich haben diese Tiere mehr oder weniger Immunität gegen die Piroplasmose erworben.

Ebenso zeigen von Piroplasmose genesene Tiere, nachdem sie von Theileriose angesteckt waren, Symptome beider Infektionen im roten Urin.

In Rußland gab in Rayons mit gemeinschaftlichem Vorkommen von Piroplasmose von Pferden und Anthrax die Vakzination gegen letztere manchmal einen Ausgang über die Norm, den man geneigt war, den Vakzinen zuzuschreiben. In der Tat erwies sich, daß unter dem Einflusse sibir-eiteriger Vakzinen die latente Piroplasmose zur aktiven übergeht und das Tier dadurch, nicht aber durch die sibir-eiterige Vakzination umkommt¹⁾.

Das „Abbrechen“ der Immunität gegen die Piroplasmose kann aber auch unspezifische Ursachen haben in der Art der Uebermüdung, Abkühlung, Ueberwärmung, ungenügender Nahrung, Schwangerschaft usw. Wir haben in unserer Praxis folgende Beobachtung gemacht: Im Winter 1925—1926 fiel im Bezirk

1) 1927 wurde zwecks Immunisation in versteckter Form befindliche Kokzidiose durch Einführung in das Blut mit *Babesiella bovis* verstärkt und bei 3 Tieren wurde dadurch ein latenter Ausgang bewirkt.

Lodeinoe Pole (Gouv. Leningrad) durch sehr großen Futtermangel auf, viele Tiere verhungerten im Laufe des Winters und Frühlings, so daß bis Anfang des Frühlingsausbruchs der Piroplasmose 1926 der Organismus der Tiere sehr geschwächt war. Tabelle VIII zeigt, daß der Prozentsatz der Rezidive 23 Proz., dagegen im vorigen Jahre unter 17,7 Proz. war. (Prozentsatz der Sterblichkeit 1926 bei natürlichem Durchmachen der Krankheit 50—60 Proz., dagegen im vorigen Jahre 1925 39,8 Proz. Dieselbe Ursache zeigten die Resultate der Behandlung: 1925 5,9, dagegen 1926 10,1 Proz. (im einzelnen bei Behandlung mit Ichthargan: Im Jahre 1925 4,9 Proz. und 1926 7,1 Proz.).

Aus diesem Beispiel ist zu ersehen, daß Futtermangel unbedingt auf die Standhaftigkeit der Immunität wirkte.

Tabelle VIII.

	1925	1926
Gesamtzahl an Piroplasmose kranker Tiere	681	595
Waren in früheren Jahren krank	147 (17,7 %)	178 (23 %)

Zum Schluß wollen wir noch eine andere Frage berühren.

In früherer Zeit, wo unsere Kenntnisse der Parasiten, welche blutigen Urin hervorgerufen, noch nicht so gut war, wie jetzt, galt als dessen Erreger in allen Weltteilen das *Piroplasma bigeminum* Smith und Kilborne, 1888. Aber schon am Anfang dieses Jahrhunderts erkannte Lignières, daß Tiere, welche in Frankreich Piroplasmose durchgemacht hatten, bei der Ankunft in Argentinien an örtlicher Piroplasmose (*tristeza*) erkrankten. Andererseits sah derselbe Autor, daß Tiere, welche gegen diese Krankheit mit der 1. Vakzine, welche Piroplasmose *bigeminum* enthielt, vakziniert wurden, manchmal gegen *tristeza* immun wurden, manchmal aber daran erkrankten und fielen. Lignières studierte diese Fälle und beschrieb eine „atypische Form“ der Piroplasmose. Weiter erwies es sich, daß diese Form eine sich ganz von der durch Piroplasmose *bigeminum* hervorgerufene Krankheit unterscheidet, deren Erreger ein besonderer kleiner Parasit ist, das *Piroplasma* (*Babesiella* s. *Françaiella*) *argentina*. Es kommen also in Argentinien 2 ganz verschiedene Parasiten vor¹⁾. In gleicher Weise sah auch Theiler, daß Vieh, welches in England die örtliche Piroplasmose überstanden hat, nach Einführung in Südafrika als Opfer der afrikanischen Piroplasmose fiel.

Diese Erscheinungen erklären sich dadurch, daß in allen diesen Ländern Parasiten vorkommen, welche nicht nur zu verschiedenen Arten, sondern auch Gattungen gehören: in England und in Frankreich gehören sie zu der Subgattung *Babesiella*, in Südafrika und Argentinien aber zu der Subgattung *Piroplasma*.

Es sind aber noch mehr paradoxe Erscheinungen beobachtet worden: Das Rind, das unempfindlich gegen das Nordamerikanische Texasfieber ist, erkrankte an dem Südafrikanischen red-water. Theiler beobachtete, daß das gegen das südafrikanische *Piroplasma bigeminum* immunisierte Vieh nicht durch diesen von der Insel Madagaskar oder der aus Indien stammenden Parasiten erkrankte, sondern an den nordamerikanischen oder mexikanischen *Piroplasma bigeminum*. Ed. Sergent und seine Mitarbeiter fanden, daß die algerische *Françaiella berbera* gegen *Babesiella bovis* oder

1) Im Nordkaukasus haben wir diese Erscheinung nicht beobachtet. In einer Herde von 73 gegen *Piroplasma bigeminum* immunisierten Tieren brach eine hervorgerufene Epizootie durch *Franç. caucasica* aus.

Françaiella argentina nicht immunisiert. Ferner sei bemerkt, daß Laveran und Nattan-Larier gefunden haben, daß *Piroplasma canis* französischer und südafrikanischer Herkunft morphologisch identisch sind, jedoch keine Immunität gegen einander bewirkten. Außerdem erweist sich, daß einige chemotherapeutische Präparate verschieden auf verschiedene Parasiten wirken. So wirkt z. B. Trypanblau gut auf die Subgattung *Piroplasma*, dagegen bei der Subgattung *Babesiella* nur auf die Vertreter der Gruppe *Babesiella* s. str. (*Babesiella bovis*) und gar nicht auf die Vertreter der Gruppe *Françaiella* (*Fr. argentina*, *Fr. berbera*, *Fr. colchica*, *Fr. caucasica* und *Fr. occidentalis*). Ichthargan wirkt gut auf *Pir. bigeminum*, *Babesiella bovis* und *Françaiella caucasica*, nicht aber auf *Françaiella colchica*.

Daraus ist zu ersehen, welche biologische Mannigfaltigkeit unter den Erregern des blutigen Urins existiert, wobei diese Mannigfaltigkeit nicht nur bei Parasiten verschiedener Gattungen und Arten auftritt, sondern auch bei solchen, die diese morphologisch identisch sind.

Diese Daten sind ganz besonders für die russischen Veterinäre berücksichtigungswert. Das mächtige Territorium von Rußland durchschneiden 2 Streifen, die von der Piroplasmose angesteckt sind. Ein Streifen zieht sich von Finnland über Karelien, das Nord-West Gebiet und Weißrußland, umfaßt einige Zentralgouvernements von Rußland, durchschneidet einige Gouvernements der Ukraine und verliert sich durch Bessarabien in den Donauebenen von Rumänien. Der andere Streifen umfaßt die Krim und möglicherweise auch den südlichen Teil der Gebiete von Ekaterinoslav und dem Don, infiziert stark das vormalige Gouv. Stavropol, den ganzen Nord- und Südkaukasus und Persien und breitet sich über ganz Turkestan aus.

Noch ganz vor kurzem wurde angenommen, daß es in ganz Rußland nur 1 *Piroplasma* gibt, und zwar im Süden (Katchinsky), im Norden (van Hellens und Krogus, Kossel, Weber, Schütz und Miessner, Beinarovitsch, Dratchinsky). Schon vor 23 Jahren vermuteten aber Dschunkovsky und Luhs, daß die südlichen und nördlichen Piroplasmen morphologisch sich von einander unterscheiden, und zwar sind die nördlichen kleiner, die südlichen aber viel größer.

Von uns und unserer Mitarbeiterin Frl. Wassilewsky wurden durch spezielle Untersuchung diese beiden Piroplasmen scharf von einander abgegrenzt, die nördliche gehört zu *Babesiella bovis*, die südliche zu *Piroplasma bigeminum*. Meine letzten Arbeiten und die meiner Mitarbeiter haben bewiesen, daß außer diesen 2 Piroplasmen in Rußland noch andere Erreger der Hämoglobinurie des Rindes vorkommen. So gibt es z. B. im Nordkaukasus außer dem *Piroplasma bigeminum* noch 2 Arten von *Françaiella caucasica* Yakimoff und Belawine, 1926, und *Françaiella calchica* Yakimoff, 1927, in Weißrußland und außer der *Babesiella bovis* noch die *Françaiella occidentalis* Yakimoff und Bourzeff, 1927, noch eine 3., die der *Françaiella caucasica* ähnlich ist, aber noch ungenügend studiert ist. Im Gouv. Leningrad wurde noch außer der *Babesiella bovis* vor kurzem die *Babesiella karelica* Yakimoff, 1927, gefunden.

Nehmen wir a priori an, daß die Tiere, welche gegen das südliche *Piroplasma bigeminum* immunisiert worden sind, sich zweifellos von der nördlichen *Babesiella bovis* und vice versa anstecken können, so muß auch noch die Frage der Identität oder Unidentität (im biologischen, nicht nur im morphologischen Sinne) aller übrigen russischen Parasiten der Subgattung *Babesiella* (*Babesiella bovis*, *Françaiella caucasica*, *Françaiella colchica* und *Françaiella occidentalis*) entschieden werden. Betreffs des *Piroplasma bigeminum* und der *Françaiella caucasica* machte Bela wine folgende

Beobachtung: eine Kuh, welche an *Françaiella caucasica* erkrankte und mit Ichthargan geheilt worden war, erkrankte nach einiger Zeit spontan an *Piroplasma bigeminum*.

Wir haben schon oben angegeben, daß die gegen *Piroplasma bigeminum* immunisierten Tiere sich durch *Françaiella caucasica* ansteckten. Unsere Beobachtungen weichen aber insofern von denen von Lignières in Argentinien ab, wo *Françaiella argentina* gut gegen *Piroplasma bigeminum* immunisiert, die letztere aber, falls nicht sehr stark gegen *Françaiella argentina* vakziniert ist, gegen dieselbe eine gewisse Resistenz verleiht, welche bei gesunden Kontrolltieren nicht beobachtet wird. Wir wissen auch nicht, wie sich die übrigen russischen Piroplasmen zu einander verhalten.

Alle diese Fragen haben nicht nur akademisches, sondern auch großes praktisches Interesse. Die Frage über die Immunisation im Nord-West-Gebiete sind bereits im Jahre 1926 gelöst worden, doch ist dieselbe im Nordkaukasus noch weit davon entfernt, weil dort außer Vertretern von *Piroplasma* und *Françaiella*, noch solche von *Theileria*, *Gonderia* und *Anaplasma* vorkommen. Lignières brauchte fast 20 Jahre, um endlich die Methode der Immunisation gegen die argentinische Tristeza, welche durch 3 Parasiten hervorgerufen wird, nämlich *Piroplasma bigeminum*, *Françaiella argentina* und *Anaplasma argentinum* festzustellen. Immunisationsversuche nur gegen die Hämoglobinurie werden im Nordkaukasus, weil dort wenigstens 5 endoglobulärische Parasiten (*Piroplasma bigeminum*, *Françaiella caucasica*, *Françaiella colchica*, *Gonderia mutans*, *Anaplasma rossicum* und vielleicht *Theileria* sp.) vorhanden sind, stark gehemmt. Dies wird besonders bewiesen, wenn es sich herausstellen sollte, daß die morphologisch identischen Parasiten in verschiedenen Gegenden des Kaukasus biologisch verschieden sind.

Bibliographie.

- 1) Babes, V., Remarque sur la découverte des parasites de l'hémoglobinurie épidémique de bovidés et du Carceag des moutons. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 33. 1909. S. 449—458). — 2) Descazeaux, Considérations étiologiques, pathogéniques et thérapeutiques sur la piroplasmose des bovidés dans l'Etat de Saint-Paul. (Bull. méd. vétér. 1913. p. 392—410). — 3) Di Domizio, P., Comportamento biologico del *Piroplasma bigeminum* nei qovini Colonia Eritrea. (Moderno Zoolatro. 1917. p. 132—136. 247—259). — 4) Donatien, A., Le diagnostic des piroplasmoses [Thèse] Toulouse. 1926. — 5) Donatien, A., et Lestoquard, F., Sur l'emploi du trypanoblu dans le traitement des piroplasmoses des ruminants. (Bull. Soc. Pathol. exot. 1927. p. 64 77.) — 6) Dschunkowsky, E. P., u. Luhs, J. M., Piroplasmosis der Rinder. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 35. 1904. S. 486—492). — 7) França, C., Sur la classification des piroplasmes et description des deux formes de ces parasites. (Archivos d. R. Instit. Bacteriol. Camara Pestana. T. 3. F. 1. 1909. p. 11—18). — 8) Id. Sur la classification de Hémospodides. (Journ. Sci. mathém. fis. e naturales. Ser. III. 1917. p. 44). — 9) Jobling, F. W., u. Wooley, P., Texas fever in the Philippine islands and the forest. (Bureau govern. labor. Manille. 1904. p. 21). — 10) Jowett, W., A further note on the drug treatment of biliary fever or malignant jaundice of the dog (canine piroplasmosis). (Agric Journ. Cape of Good Hope. Vol. 36. 1910. p. 541—546). — 11) Id., Some canine notes. (Ibid. Vol. 37. 1910. p. 518—527). — 12) Knuth, P., Ueber Piroplasmosen bei europäischen Rindern, mit besonderer Berücksichtigung ihrer Aetiologie (C. B. d. Congr. intern. de méd. vétér. London 1914). — 13) Ders. u. Du Toit, P., Tropische Krankheiten der Haustiere. 1922). — 14) Kossel, Weber, Schütz u. Miessner, Die Hämoglobinurie der Rinder. (Arb. a. d. kaiserl. Gesundheitsamt. Bd. 20. 1903). — 15) Kowalewsky, F., Complication de la peste bovine par la piroplasmose. (Journ. méd. vétér. 1908. 31/III). — 16) Laveran, A., et Nattan-Larier, Piroplasmose canine d'Europe et d'Afrique. (Ann. Instit. Pasteur. T. 28. 1913. p. 701—717). — 17) Lignières, Nouvelle contribution à l'étude de la Tristeza ou piroplasmose bovine. (Recueil de méd. vétér. 1901. p. 478—483). — 18) Id., La tristeza dans la Republ. Argentine. (Bull. Soc. centr. méd. vét. 1901. p. 135—774 u. 818—880). — 19) Id., La piroplasmose bovine; nouvelles recherches et observation (Ibid. T. 8). — 20) Id., La vaccine de la piroplasmose bovine. (Rev. gén. de méd. vétér. 1914. p. 489—506). — 21) Id., La vaccination des bovidés contre l'anaplasmoses: l'*Anaplasma*

inculé au mouton et à la chèvre s'atténue etc. (Bull. Soc. Pathol. exot. 1919. p. 765—779). — 22) Id., Etude et prophylaxie des piroplasmoses, babésieloses et anoplasmoses bovines dans la Rep. Argentine. (Bull. Soc. Sc. vétér. Lyon. 1924. No. 1). — 23) Martoglio, F., Stella, V., et Carpano, M., Contributo alla conoscenza ed alla classificazione dei piroplasmii. (Ann. ig. sper. T. 21. (S. S.). F. 304. 1911. p. 390—452). — 24) Martoglio, F., Stella, V. e Provenzale, F., Sulla recettività dei bovini somali verso il Piroplasma bigeminum. (Ibid. T. 23. 1913. p. 315—324). — 25) Memmo, P., Martoglio, F., e Adoni, P., Infezioni protozoaire negli animali domestici in Eritrea. (Ibid. 1905. p. 1—16). — 26) Nicolle, M., et Adil-Bey, Malaria des bovidés. (Annal. Inst. Pasteur. 1899. p. 337. et 1902. p. 291). — 27) Nocard, E., Maladies microbiennes des animaux domestiques. — 28) Ollwig u. Manteufel, Die Babesien Pro-wazeks. (Handb. d. path. Protoz. Lief. 5. 1912. S. 517). — 29) Pérard, Ch., Les piroplasmoses. Importance économique. Prophylaxie. Arch. Zootechnie. 1925. juillet). — 30) Sérgent, Ed., Beguet, M., Leritier, A., et Boquet, A., Etudes sur les piroplasmoses d'Algérie. II. III. IV. et V. (Bull. Soc. Pathol. exot. 1913. No. 6. 1914. No. 7). — 31) Theiler, A., Beitrag zur Frage der Immunität bei der Piroplasmose der Hunde. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 27. 1904. S. 401—405). — 32) Id., The Piroplasma bigeminum of the immune of (Journ. Roy. Army med. Corps. Vol. 2. 1904. p. 20). — 33) Id., Prophylaxis of the tropical diseases. (9. Congr. Internat. méd. vétér. Haag 1909). — 34) Id., The treatment of red water in cattle with Trypanlul. (Agric. Journ. Union S. Africa. Vol. 2. 1911. p. 562—569). — 35) Id., Das Trypanblau und Trypanroth in der Behandlung der Piroplasmosen und deren praktische und theoretische Bedeutung. (Ztschr. f. Infektionskrankh. d. Haust. Bd. 11. 1912. S. 305—320). — 36) Velu, M., Thérapeutique générale des piroplasmoses. (Rév. vét. 1923. janv.). — 37) Id., Les piroplasmes et les piroplasmoses. 1922. — 38) Yakimoff, W. L., Piroplasmosis (babésiellosis, red-water) of the cattle of the nord-west of Russia. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 100. H. 4—6. 1921. — 39) Id., Der Kampf gegen die Piroplasmose der Rinder im Petrograder (Leningrader) Gouvernement im Jahre 1924. (Ztschr. f. Infektionskrankh. d. Haust. Bd. 29. H. 1—2. 1926. — 40) Id., Der Kampf gegen die Piroplasmose der Rinder im Petrograder (Leningrader) Gouvernement im Jahre 1925. (Ibid. Bd. 31. 1927. S. 120—140). — 41) Id., Le trypanobleu agit-il sur les babesielles? (Bull. Soc. Pathol. exot. 1926. p. 173—186). — 42) Id., et Belawine, W. S., Une nouvelle espèce du genre Babesiella. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 103. 1927. S. 315—320). — 43) Id., Rinderanaplasmosis in Rußland. (Ibid. Bd. 103. 1927. S. 419—421). — 44) Ibid., u. Bourzeff, W. F., Rinderpiroplasmosis in Weißrußland. (Arch. f. Protistenkd. Bd. 27. 1927. S. 239—249).

Nachdruck verboten.

Ueber die Natur der Allergie durch Askariden.

[Aus dem Mikrobiologischen Forschungsinstitut des Volksbildungskommissariats in Moskau (Direktor Prof. J. L. Kritschewsky).]

Von Dr. med. **O. Dukelsky** und **E. Golubewa**.

Mehrmals ist beobachtet worden, daß bei Menschen, welche in Kontakt mit Askariden kommen, krankhafte Erscheinungen eintreten.

Schon im Jahre 1910 hat Goldschmidt (1) über mehrfache Erkrankungsfälle in 20 zoologischen Laboratorien, in denen mit Askariden gearbeitet wurde, berichtet. Bei vielen Laboratoriumsarbeitern entstanden Urtikaria, Konjunktivitis, Schnupfen und Husten, welche auf eine Reizung der Haut oder Schleimhäute hindeuteten. In manchen Fällen entstand eine starke Dyspnoe, oder auch Anfälle bronchialen Asthmas. Alle diese Symptome vergingen meistens, wenn der Erkrankte seine Arbeit mit Askariden einstellte. In manchen Fällen jedoch mußten die Erkrankten das Klima wechseln, um sich von den schweren Asthmaanfällen zu befreien. Es muß darauf hingewiesen werden, daß bei den Personen, bei welchen einmal irgendwelche Krankheits Symptome eingetreten sind, dieselben bei wiederholtem Kontakt mit Askariden an Stärke zunehmen; gleichzeitig entsteht bei solchen Personen eine derart gesteigerte Sensibilität gegenüber Askariden, daß schon der Geruch dieser Parasiten allein dazu genügt, um einen Krankheitsanfall hervorzurufen.

In manchen Fällen entstehen schwere Krankheitssymptome schon nach dem 1. Kontakt mit Askariden oder sogar nach dem Aufenthalt in einem Zimmer, in dem Parasiten der genannten Art gehalten wurden.

Weinberg (2) berichtet ebenfalls über einige Fälle von Konjunktivitis, Ausschlag und Dyspnoe bei Laboratoriumsarbeitern, auf deren Hände die Leibeshöhlenflüssigkeit der Askariden gespritzt war.

Während einige Menschen eine hohe Sensibilität gegenüber Askariden besitzen, können viele andere die Parasiten berühren, ohne daß bei ihnen irgendwelche krankhafte Symptomen eintreten.

Die Natur der oben beschriebenen Erscheinungen, welche bei den einen Individuen ausbleiben, bei den anderen eintreten und allmählich an Stärke zunehmen, gibt Veranlassung, diese Erscheinungen mit den Allergieerscheinungen zu vergleichen, mit denen sie höchst ähnlich sind.

Mehrere Autoren haben sich mit der Frage über die Ursache der eigenartigen Wirkung der Askariden auf manche Individuen befaßt, sind aber zu widersprechenden Resultaten gekommen. Während Guerrini (3) sowie Alessandrini und Paolucci (4) die Leibeshöhlenflüssigkeit der Askariden als ungiftig betrachten, hat Weinberg (2) einen letalen Ausgang bei Meerschweinchen beobachtet, denen diese Flüssigkeit intravenös eingeführt wurde. Weinberg berichtet auch über das Eintreten von Konjunktivitis, Dyspnoe und profusum Schwitzen bei Pferden, deren Konjunktive mit einigen Tropfen Flüssigkeit benetzt worden war, und über die Versuche von Leroy, welcher Hunde durch intravenöse Injektion von 8—10 ccm der Leibeshöhlenflüssigkeit von Askariden pro 1 kg Tier getötet hatte. Diese Versuche zeigen, daß den Askariden eine toxische Wirkung eigen ist.

Flury (5) hat versucht, die Natur dieser toxischen Wirkung zu bestimmen, indem er die Leibeshöhlenflüssigkeit der Askariden genau analysiert hat. Es kann aber keiner der von Flury nachgewiesenen Stoffe (Valeriansäure, Buttersäure u. a.) Asthmaerkrankungen bei Menschen verursachen. Die Anwesenheit dieser Stoffe in der Askaridenflüssigkeit kann auch der Tatsache keine Erklärung geben, daß Menschen, welche keine Askariden berührt hatten und sich nur im Zimmer befanden, wo Askariden anwesend waren, ebenfalls erkrankten.

Die Tatsache, daß die Krankheitssymptome mit der Zeit an Intensität zunehmen, hat manche Autoren zu der Vermutung veranlaßt, daß hier eine Sensibilisierung des Organismus durch kleine Mengen Askaridenflüssigkeit mit nachfolgenden Anaphylaxieerscheinungen statt finde. Es haben sich mit dieser Frage verschiedene Arbeiten beschäftigt.

Ugo Mello (6) hat Meerschweinchen mit Leibeshöhlenflüssigkeit oder mit Askaridenextrakt subkutan sensibilisiert und hat am 25. Tage den Versuchstieren 0,25—0,5 ccm derselben Flüssigkeit, welche bei der Sensibilisierung gebraucht worden war, intravenös eingeführt. Bei allen Meerschweinchen entstand ein typischer anaphylaktischer Schock mit letalem Ausgang. Normale Tiere existierten, nur in dem Falle, wenn ihnen 1 ccm Askaridenflüssigkeit pro 100 g Körpergewicht eingeführt wurde. Auf Grund dieser Versuche hält Mello die Möglichkeit, einen Tierorganismus durch Askaridenflüssigkeit zu sensibilisieren, für bewiesen.

Flury (5) hat Hunden Leibeshöhlenflüssigkeit von Askariden subkutan injiziert (14mal binnen 24 Tagen). Nach den ersten Injektionen entstand bei den Tieren Erbrechen und Durchfall, welche alsdann aufhörten. Flury betrachtet diesen Umstand als Gewöhnungsercheinungen, obgleich die Tiere während der ganzen Versuchsperiode an Gewicht verloren. Der Autor ist der Meinung, daß die Vergiftung durch Askaridenflüssigkeit keine Anaphylaxieerscheinung ist, daß jedoch der Symptomenkomplex solcher Vergiftung einem anaphylaktischen Schock gleicht.

Weinberg und Julien (7) beschreiben 2 Todesfälle bei Pferden, deren Konjunktiva mit Askaridenflüssigkeit benetzt worden war. Sie betrachten diese Todesfälle als einen anaphylaktischen Schock und äußern die Vermutung, die Pferde seien früher durch Askariden sensibilisiert worden, welche sich in ihrem Darmkanal befanden und von denen sie sich später befreit hätten.

Hiermit widerspricht Weinberg der Ansicht, welche er in einer anderen Arbeit (2) geäußert hat: nämlich, daß die Leibeshöhlenflüssigkeit der Askariden toxisch wirke, und daß bei den Tieren, in deren Darmkanal Askariden anwesend sind, eine Immunität gegen das Askaridentoxin eintrete.

Es ist also bisher die Natur der krankhaften Erscheinungen, die durch die Einführung der Leibeshöhlenflüssigkeit oder des Extraktes von Askariden verursacht werden, nicht genügend geklärt worden; gleichfalls ist mit Bestimmtheit nicht festgestellt worden, ob es möglich ist, einen Organismus durch Askaridenflüssigkeit zu sensibilisieren.

Diese Frage steht in naher Verbindung mit der Frage über die Natur der krankhaften Erscheinungen, die bei Menschen, welche mit Askariden arbeiten,

beobachtet werden. Auf Anregung des Herrn Prof. Kritschewsky haben wir uns mit dieser Frage befaßt. Wir haben Meerschweinchen mit Leibeshöhlenflüssigkeit von *Ascaris megalocephala* subkutan sensibilisiert. Am 11.—12. Tage fand die Probe statt (intravenös). Der Versuch I bildet eine Ausnahme, insofern, als in dieser Serie die Sensibilisierung der Tiere gleichzeitig zur Bestimmung der primären Toxizität der Askaridenflüssigkeit diente und infolgedessen intravenös geschah. Bei der Sensibilisierung und bei der Probe wurde immer frisches Material verwendet. Es wurde stets die Leibeshöhlenflüssigkeit von mehreren Askariden gemischt, da bekannt ist, daß die Flüssigkeit verschiedener Individuen eine ungleiche Toxizität besitzt. Zwischen Sensibilisierung und Probe vergingen 11—22 Tage, je nachdem es gelang, Askariden zu gewinnen. Nachfolgend seien unsere Protokollen wieder gegeben.

Versuch I.

Nr. der Tiere	Gewicht in g	11. 12. 25 Sensibilisierung	2. 1. 26 Probe	Resultat
1	400	0,5 ccm	0,5 ccm	Typischer Schock. † n. 1 Min. Typisches anatomisches Bild bei der Sektion
2	320	0,1 „	1,0 „	Schock. † n. 4 Min. Dasselbe Bild
Kontrollen				
3	420	—	0,5 ccm	Leichter Schock. Das Tier erholt sich vollkommen
4	390	—	1,0 „	Jucken der Schnauze. Sonst gesund

Der Schock wurde immer von Manegebewegungen, starken Krämpfen, Lähmung der Pfoten und Asphyxie begleitet. Die Tiere starben binnen weniger Minuten. Es fand stets eine Sektion der verendeten Meerschweinchen statt, wobei in allen Fällen ein anatomisches Bild konstatiert wurde, welches für einen anaphylaktischen Schock höchst charakteristisch war.

Im Versuch I hat die Dosis 1,0 ccm Leibeshöhlenflüssigkeit einen Schock beim sensibilisierten Meerschweinchen verursacht, hat aber keine toxische Wirkung auf ein normales Tier ausgeübt. Deshalb haben wir 1,0 ccm pro 320 g Körpergewicht als Ausgangsdosis beim folgenden Versuch II angenommen.

Versuch II.

Nr. der Tiere	Gewicht in g	18. 1. Sensibilisierung	29. 1. Probe	Resultat
5	450	0,5 ccm	1,4 ccm	Schock. Das Tier hat sich erholt
6	590	0,5 „	1,8 „	Schock. † n. 2 Min. Typisches anat. Bild
Kontrolle				
7	490	—	1,5 ccm	Schock. † n. 3 Min. Typisches anat. Bild

Der Tod des Kontrolltieres hat gezeigt, daß die Dosis 1,0 Leibeshöhlenflüssigkeit pro 320,0 Tier auf manche Normaltiere toxisch wirken kann. Deswegen haben wir im Versuch III die Dosis vermindert und 0,5 ccm pro 400,0 Tier als Ausgangsdosis angenommen. Dieselbe wurde je nach dem Gewicht der Versuchstiere geändert.

Versuch III.

Nr. der Tiere	Gewicht in g	29. 1. Sensibilisierung	2. 2. Probe	Resultat			
8	320	0,5 ccm	0,45 ccm	Schock.	† n. 2 Min.	Typ.	anat. Bild
9	430	0,5 „	0,5 „	„	† „ 3 „	„	„ „
10	450	0,5 „	0,57 „	„	† „ 4 „	„	„ „
11	460	0,5 „	0,55 „	„	† „ 4 „	„	„ „
12	260	0,5 „	0,3 „	„	† „ 4 „	„	„ „

Kontrolle

13	390	—	0,5 ccm	Leichter Schock.	Gänzlich erholt
----	-----	---	---------	------------------	-----------------

Es hat also die Dosis von 0,5 ccm Leibeshöhlenflüssigkeit pro 400,0 Tier bei allen sensibilisierten Meerschweinchen einen tödlichen Schock provoziert. Jedoch ist beim Kontrolltier ebenfalls ein leichter Schock eingetreten. Deshalb haben wir im folgenden Versuch die Dosis bis 0,4 ccm pro 400,0 Tier vermindert.

Versuch IV.

Nr. der Tiere	Gewicht in g	14. 6. Sensibilisierung	28. 6. Probe	Resultat			
14	240	0,5 ccm	0,24 ¹⁾ ccm	Schock.	Das Tier hat sich erholt		
15	340	0,5 „	0,3 „	„	† n. 3 Min.	Typisches anat.	Bild
16	280	0,5 „	0,28 „	„	† „ 4 „	„	„ „
19	480	0,5 „	0,48 „	„	† „ 17 „	„	„ „

Kontrollen

17	270	—	0,28 ccm	Keine Erscheinungen			
18	340	—	0,34 „	„	„	„	„

1) In der Tat ist ungefähr 0,2 ccm eingeführt worden.

Im folgenden Versuch haben wir die Dosis Leibeshöhlenflüssigkeit bei der Probe bis auf 0,3 ccm pro 400,0 Tier vermindert.

Versuch V.

Nr. der Tiere	Gewicht in g	18. 6. Sensibilisierung	8. 7. Probe	Resultat			
20	290	0,5 ccm	0,2 ccm	Schock.	Das Tier hat sich erholt		
21	330	0,5 „	0,25 „	„	† n. 50 Min.	„	„
22	330	0,5 „	0,25 „	„	Das Tier hat sich erholt		

Hieraus ergibt sich, daß entweder die Dosis 0,3 ccm pro 400,0 g Tier keinen tödlichen Schock provozieren kann, oder der Tod nur nach langer Zeit eintritt. Wir haben deshalb beim Versuch VI die Dosis wieder bis 0,4 auf 400,0 g Tier gesteigert.

Versuch VI.

Nr. der Tiere	Gewicht in g	18. 7. Sensibilisierung	8. 8. Probe	Resultat			
23	500	0,5 ccm	0,5 ccm	Schock.	† n. 5 Min.	Typisches anat.	Bild
24	400	0,5 „	0,4 „	„	† „ 3 „	„	„ „
Kontrollen							
25	350	—	0,35 ccm	Leichter Schock. Das Tier hat sich erholt			
27	290	—	0,3 „	Schock,	Das Tier hat sich erholt		
26	340	—	0,35 „	„	† n. 3 Min.	„	„
28	320	—	0,32 „	Keine Erscheinungen			

Wenn bei den Kontrolltieren ein Schock stattfand, verlief derselbe ganz ebenso wie bei den sensibilisierten Tieren. Die Sektion der ad exitum gekommenen Kontrolltiere zeigte immer ein für einen anaphylaktischen Schock typisches Bild.

Zusammenfassend können die Resultate unserer Versuche in folgender Tabelle erbracht werden.

Dosis, die bei der Probe eingeführt wurde	Gesamtzahl der Versuchstiere	Resultat		
		Schock mit letalem Ende	Schock. Das Tier hat sich erholt	Keine Er- scheinungen
A. Sensibilisierte Meerschweinchen				
1,0 ccm pro 320,0 Tier	3	2	1	—
0,5 „ „ 400,0 „	6	6	—	—
0,4 „ „ 400,0 „	6	5	1	—
0,3 „ „ 400,0 „	3	1	2	—
B. Kontrolltiere				
1,0 ccm pro 400,0 Tier	1	—	1	—
1,0 „ „ 320,0 „	1	1	—	—
0,5 „ „ 400,0 „	2	—	2	—
0,4 „ „ 400,0 „	6	1	2	3

Es ist aus dieser Tabelle und aus den oben angeführten Protokollen unserer Versuche ersichtlich, daß für die Leibeshöhlenflüssigkeit der Askariden keine bestimmte Grenze zwischen der schockauslösenden Dosis für präparierte Tiere und der für Normaltiere toxischen Dosis festgestellt werden kann. Die Verminderung der schockauslösenden Dosis von 0,5—0,4 und 0,3 ccm verursacht eine bedeutende Abschwächung des Schocks bei präparierten Tieren, wobei in mehreren Fällen die Meerschweinchen am Leben bleiben; jedoch können dieselben Dosen bei manchen Normaltieren einen typischen Schock verursachen, welcher oft letal endet.

Wir glauben deshalb, daß der Symptomenkomplex, welcher bei unseren Versuchstieren beobachtet wurde, keineswegs in allen Fällen als ein echter anaphylaktischer Schock betrachtet werden darf. Im Gegensatz zu Mello, welcher derartige Erscheinungen stets als Anaphylaxie betrachtet, sind wir zu dem Schluß gekommen, daß der bei unseren Meerschweinchen eintretende Schock in manchen Fällen nicht infolge einer vorherigen Sensibilisierung stattfand, sondern nur durch die primäre Toxizität der Leibeshöhlenflüssigkeit der Askariden verursacht war und folglich ein Allergiephänomen darstellte.

Unsere Ergebnisse liefern eine neue Bestätigung der Theorie von Kritschewsky, welcher die Ansicht geäußert hat, daß die primäre Toxizität der Antigene und die Fähigkeit derselben, einen Schock bei präparierten Tieren auszulösen, ein und dieselbe Pathogenese haben, nämlich eine Störung der Dispersität der Organismuskolloiden. Bei manchen Menschen, die eine besondere Sensibilität zu Askariden besitzen, und bei manchen Tieren, sind die Zellen- und Blutkolloide gegenüber den aktiven Stoffen der Leibeshöhlenflüssigkeit der Askariden höchst labil. Bei den meisten Individuen entsteht eine solche Labilität nur infolge einer Sensibilisierung und äußert sich, wenn dem Individuum das primär atoxische Antigen wiederholt eingeführt wird.

Auf Grung unserer Versuche ziehen wir die Schlußfolgerung, daß die sogenannte Allergie gegenüber Askariden verschiedener Herkunft sein kann. Bei den meisten Individuen entstehen krankhafte Erscheinungen, die eine echte

Anaphylaxie darstellen, jedoch treten bei manchen Individuen dieselben Erscheinungen infolge der primären Toxizität der antigenen Stoffe, welche in der Leibeshöhlenflüssigkeit der Askariden vorhanden sind, ein.

Literatur.

- 1) Goldschmidt, Münch. med. Wochenschr. 1910. Nr. 38. — 2) Weinberg, Med. Microbiologie Bd. 3 (russisch). — 3) Guerrini, Lo Sperimentale. Vol. 64. 1910. — 4) Alesandrini et Paoluci, Ann. d'Ig. speriment. 1909. — 5) Flury, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. Bd. 67. 1912. — 6) Ugo Mello, Compt. rend. Soc. de Biol. Nr. 71. 1910. S. 289. — 7) Weinberg et Julien, Ibid. 1913. Nr. 20.

Nachdruck verboten.

Richtigstellung zu der Notiz von Kraus: „Geschichtliches zum Aufsatz E. Friedbergers über kryptantigenes Virus“.

(Dieses Centralblatt Bd. 107. S. 282.)

Von **E. Friedberger**, Berlin-Dahlem.

Ich habe in einer früheren Erwiderung¹⁾ auf Angriffe von R. Kraus gegen meine Arbeiten über kryptantigenes Virus beim Typhus abdominalis²⁾ darauf hingewiesen, daß seine Behauptung, Fontes (1910) sowie Kirchenstein (1921) hätten vor mir ein unsichtbares und unzüchtbares Virus bei bakteriellen Infektionen nachgewiesen, falsch war, da diese Arbeiten ganz andere Dinge behandelten.

Nunmehr beruft sich Kraus erneut auf Arbeiten von Hort und Ingram.

Da diese Arbeiten unmittelbar vor oder zu Anfang des Weltkrieges erschienen sind, sind sie weder in unseren Bibliotheken vorhanden, noch in unseren einschlägigen Organen referiert. Auch R. Kraus hat erst in letzter Zeit, wie er schreibt, durch H. Schmidt, Marburg, Arbeiten dieser Autoren „im Original“ erhalten.

Ich habe eine Reihe Arbeiten von Hort und Ingram nunmehr durch lebenswürdige Vermittlung des Herrn Dr. Felix, London, vom Lister-Institut erhalten. Auch hat mir Herr Professor Schmidt, Marburg, in dankenswerter Weise die beiden Veröffentlichungen von Hort übersandt, die er auch Herrn Professor Kraus zur Verfügung gestellt hatte, und auf die sich dieser in seiner Notiz bezieht.

In der einen Arbeit, aus der hier Kraus einen Passus zitiert (Hort, „The Recognition of Haemic Infections of the Urine“. Brit. medical association, Juli 1914), ist überhaupt nicht von Typhus abdominalis die Rede, sondern von Flecktyphus, wo die Autoren in Irland einen kleinen, für Affen pathogenen, polymorphen Kokkobazillus in Blut und Urin unmittelbar nach der Entnahme festgestellt haben, der nachher in eine größere nicht mehr pathogene Bazillenform umschlagen soll. Das ist schon an sich etwas ganz anderes, als kryptantigenes Virus.

1) Dieses Centralbl. Bd. 102. 1927. S. 252.

2) Friedberger und Meißner, Klin. Wochenschr. 1923. Nr. 10. Med. Klinik. 1923. S. 403. — Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 75. 1923. Nr. 5/6. — Friedberger u. Cecchini, Klin. Wochenschr. 1923. Nr. 52; Friedberger, ebenda 1926. Nr. 18; Zeitschr. f. Immunitätsf. Bd. 53. 1927. S. 339.

Offenbar hat aber Kraus außerdem „typhus“ für Typhus abdominalis gehalten, „typhus (fever)“ bedeutet aber auf englisch Fleckfieber. Unser „Typhus“ heißt bekanntlich „typhoid“ oder „enteric fever“.

Ganz sicher ist Kraus diese Verwechslung bei der zweiten Arbeit, deren Sonderabdruck ihm gleichfalls von Herrn Schmidt zugeschickt worden ist, unterlaufen. Diese Arbeit (*The Life-History of bacteria*. Brit. med. Journal. 5. V. 1917) enthält unter anderem Angaben und Abbildungen über polymorphe Formen des Typhusbazillus, wie sie schon über 10 Jahre zuvor von Almquist beschrieben worden sind. (Siehe Chart. 1 bei Hort.)

(Ich verweise bezüglich solcher filtrierbarer, sichtbarer „Bakterienableger“ auf meine Ausführungen in der Zeitschrift für Immunitätsforschung Bd. 53. H. 3/4, S. 83.)

Sie haben mit dem unsichtbaren und unzüchtbaren kryptantigenen Virus nichts zu tun.

Kraus schreibt wörtlich:

„In den weiteren Arbeiten finden sich Untersuchungen über filtrierbare Formen bei Typhusbazillen. Zahlreiche Abbildungen über den Entwicklungszyklus sind beigegeben. *The etiology of Typhus fever*. Br. Med. J. 1914. *The biology of Typhus fever*. Br. Med. Assoc. Aberdeen 1919¹⁾ Typhus fever Br. Med. J. 1915 *The life-history of bacteria*. Br. Med. J. 1919²⁾ faßt die Ansichten der Autoren zusammen.“

In keiner dieser Arbeiten, außer der letzten schon oben erwähnten, ist von Typhus abdominalis die Rede, sie handeln alle von Fleckfieber, englisch „Typhus fever“. Kraus hat aber anscheinend außer der zuletzt erwähnten „*The life history of bacteria*“ (Brit. medical Journal. 5. V. 1917), die er von H. Schmidt erhalten hat, keine dieser Arbeiten gesehen, sondern er hat offenbar die von ihm zitierten Literaturstellen lediglich aus dem Literaturverzeichnis der vorerwähnten ihm von H. Schmidt zur Verfügung gestellten Arbeit abgeschrieben. Er hätte sonst merken müssen, daß in allen den sonst von ihm zitierten Arbeiten nichts über Typhus abdominalis (Typhoid) steht, sondern daß es sich ausschließlich um Arbeiten über Fleckfieber handelt, in denen die Autoren den vorerwähnten von ihnen gezüchteten pleomorphen kleinen Kokkobazillus beschreiben.

Kraus hat also hier offensichtlich wieder „Typhus“ für Typhus abdominalis gehalten.

Hätte Kraus die Arbeiten, die er hier zitiert, gelesen, oder hätte er sich nur ein englisches Lexikon zur Hand genommen, so wäre ihm die Verwechslung nicht unterlaufen, und seine ganze Polemik hätte sich erübrigt.

„An den Zitaten der Arbeiten Hort und Ingram ist nicht zu zweifeln“, wie Kraus sagt, aber sie beziehen sich auf ganz andere Dinge als Typhus abdominalis.

1) Statt 1919 muß es heißen 1914.

2) Statt 1919 muß es heißen 1917.

Berichtigung zur Arbeit Schüffner, „Malaria tertiana“ in Heft 5/6 des 108. Bandes:

Durch ein Versehen sind die 7 Textfiguren nicht mit den Nummern der Originalarbeit von „Schaudinn“, aus der sie stammen, versehen worden. Sie kommen deshalb hier nochmals zum Abdruck.

Reproduktionen der Schaudinn'schen Figuren mit der ursprünglichen Numerierung. (Arb. Reichs-Ges.-Amt 1902.)

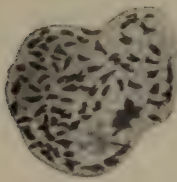


Fig. 104.



Fig. 105.

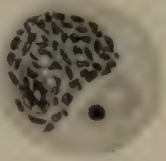


Fig. 92.

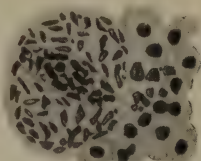


Fig. 93.

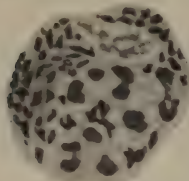


Fig. 108.

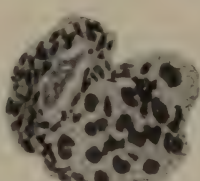


Fig. 109.

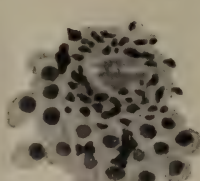


Fig. 110.

Fig. 104—105 jüngste Stadien der Rückbildung. 108—110 ältere und reife Stadien. Fig. 92—93 Doppelinfektionen. 93 Mikrogametozyt mit Sporulation.

Inhalt.

Berger, E., u. Stähelin, Ad., Studien über den Mechanismus der Trichinelleninfektion. IV. Mitteilung: Das Verhalten gelähmter Muskeln. S. 397.

Dukelsky, O., u. Golubewa, Ueber die Natur der Allergie durch Askariden. S. 449.

Friedberger, E., Richtigstellung zu der Notiz von Kraus: „Geschichtliches zum Aufsatz E. Friedbergers über kryptantigenes Virus“. S. 454.

Gieszezykiewicz, Marian, Ueber die Züchtung der Gonokokken. S. 356.

Gutstein, M., u. Neisser, H., Ueber den Nachweis der Polkörnchen bei Diphtherie. Zur mikroskopischen Diphtheriediagnose. S. 353.

Hakki, Ismail, Ueber die Verbreitung von Darmparasiten in der Türkei. S. 393.

Hotta, Yukitata, Der Einfluß der Ernährung auf die natürliche Resistenz. Mit 6 Kurven im Text. S. 413.

Markoff, Wl., Bemerkung zu Veröffentlichungen über die sog. Pseudobakteriophagie bei Milzbrandbazillen; zugleich Beitrag zur Frage der Variation des Milzbrandbazillus. S. 371.

Mießner, H., u. Baars, G., Entgegnung zu dem Artikel von Dr. Otto Herrmann „Ueber einmalige obligatorische Schutzimpfung der Hunde gegen Tollwut“. S. 433.

Prášek, E., u. Prica, M., Agglutinationsreaktion bei Rhinosklerom. Bakteriophagenstudien. II. Mit 1 Tafel. S. 376.

Reymann, G. C., Vergleichende Untersuchungen über das Reduktionsvermögen der anaëroben und aëroben Bakterien. Mit 4 Abbildungen im Text. S. 401.

Schern, Kurt, Beweis die Mäusepathogenität der aus Ascoli-positiven Häuten gezüchteten Milzbrandstämme etwas für die Gefährlichkeit solcher Häute? S. 369.

Schern, Kurt, u. Rossi-Lema, Libero, Ueber Trypanosomen. VII. Mitteilung: Blutzuckerwerte bei experimentell mit Malaria infizierten Tieren. Mit 3 Kurven im Text. S. 394.

Schüffner, W., Berichtigung zur Arbeit „Malaria tertiana“. S. 456.

Takayanagi, G., Agglutinatorische Einteilung von *Bacillus faecalis* alkaligenes. S. 383.

— Agglutinatorische Einteilung von *Coccobacillus foetidus ozaenae* von Perez. S. 388.

van den Hoven van Genderen, Jeanne, Die erwärmten Virus fixe-Emulsionen von Puscariu und die danach aufgetretenen Lähmungen. S. 430.

Yakimoff, W. L., Zur Frage der Immunität bei Piroplasmosen des Rindes. S. 438.

Inhaltsverzeichnis.

I. Verzeichnis der in Band 108 enthaltenen Arbeiten.

- Baars, G., s. Mießner, H.**
- Barg, G. S.,** Studien über die biologischen Eigenschaften der Filtrate nach Besredka. II. Versuche zur Analyse der immunisierenden Wirkung der Staphylokokkenfiltrate. 341
- Berger, E., u. Stähelin, Ad.,** Studien über den Mechanismus der Trichinelleninfektion. IV. Mitteilung: Das Verhalten gelähmter Muskeln. 397
- Bürger, M., u. Grütz, O.,** Ueber mykotischen purpurroten Zahnbelag (Streptotrichosis dentium rubra). 258
- Burtscher, J., u. Lauter, R.,** Zur Frage der experimentellen Kaninchengonorrhöe. 245
- v. Darányi, J.,** Beitrag zur Konservierung von Bakterienkulturen mit Paraffin. 160
- David, Hans,** Ueber das Vorkommen von Wutvirus im Gehirn schutzgeimpfter gesunder Tiere. I. Mitteilung. 49
- Dehmel, H., s. Wolters, K. L.**
- Diernhofer, Karl,** Untersuchungen über den Bacillus pyogenes und den Pfeilerschen „Bazillus der bösartigen Euterentzündung“. 280
- Dik, J. H., s. van den Hoven van Ganderen, Jeanne.**
- Dubrowinski, S. B., Kranzfeld, A. M., Rosenfeld, W. D., u. Salamandra, E. G.,** Zur Hakenwurmverbreitung in Turkmenistan. 172
- Dukelsky, O., u. Golubewa, E.,** Ueber die Natur der Allergie durch Askariden. 449
- Feldmann, F., s. Jelin, W.**
- v. Fischer, Hans,** Versuche zum Nachweis der Spirochaeta pallida in den Lymphdrüsen von Paralytikern. 247
- Fischer, K.,** Die Deutung der Ergebnisse von Desinfektionsversuchen. 327
- Fortner, Joseph,** Ein einfaches Plattenverfahren zur Züchtung strenger Anaerobier (anaerobe Bazillen — filtrierbare anaerobe Bakterien — Spirochaeta pallida). 155
- Friedberger, E.,** Richtigstellung zu der Notiz von Kraus: „Geschichtliches zum Aufsatz E. Friedbergers über kryptantigenes Virus“. 454
- Gerbasi, M., u. Giuffrè, M.,** Beitrag zur Kenntnis des Poliomyelitis-, Encephalitis- und Herpesvirus. 58
- Gieszezykiewicz, Marian,** Ueber die Züchtung der Gonokokken. 356
- Gildemeister, E., u. Karmann, P.,** Bestehen zwischen Variolavakzine und Lyssa Immunitätsbeziehungen? II. Mitteilung. 254
- Giuffrè, M., s. Gerbasi, M.**
- Golikova, S.,** Bacterium coli im Wirkungsgebiet alkalibildender Mikroben. 213
- Golubewa, E., s. Dukelsky, O.**
- Groß, Hans,** Ueber Staphylokokkenfermente. 241
- Grütz, O., s. Bürger, M.**
- Gurvitsch, B. M.,** Zur Differenzierung virulenter und avirulenter Rotzkulturen mittels des Phänomens der Methylenblau-reduktion. 177
- Gutstein, M., u. Neisser, H.,** Ueber den Nachweis der Polkörnchen bei Diphtherie. Zur mikroskopischen Diphtheriediagnose. 353
- Hakki, Ismail,** Ueber die Verbreitung von Darmparasiten in der Türkei. 393
- Heim, Ludwig,** Die Unterscheidung der Paratyphus B-, Enteritis- und Suipestifer-Bakterien, insbesondere mit Hilfe der Gelatineplatte. 223
- Hobmaier, A., u. M.,** Morphologie und Biologie der Larve von Gastrophilus pecorum. 163
- Hoffenreich, F.,** Kapselsubstanz aus Bacillus avisepitcus. 87
- Hotta, Yukitaka,** Der Einfluß der Ernährung auf die natürliche Resistenz. 413
- van den Hoven van Ganderen, Jeanne,** Die erwärmten Virus fixe-Emulsionen von Puscariu und die danach aufgetretenen Lähmungen. 430
- **u. Dik, J. H.,** Zur Frage des Vorkommens von Virus fixe im Gehirn bei der Antirabiesbehandlung. 52

- Jelin, W., u. Feldmann, F.,** Ueber das Schicksal des Timothee-Bazillus im tierischen Organismus und über durch diesen Bazillus hervorgerufene pathologisch-histologische Veränderungen. I. Mitteilung. 41
- Kalwaryjski, Bernard Eug.,** Ueber Jodaufspeicherung und Jodbindung durch die Muskeltrichinellen. 186
- Kapeller,** Ueber den mikroskopischen Tuberkelbazillennachweis. 7
- Karmann, P., s. Gildemeister, E.**
- Klieneberger, E.,** Ueber die Anfertigung von Schimmelpilzpräparaten für Kurszwecke. 207
- Kostylew, N. N.,** Acanthocephalen der Fische des Goktscha-Sees. 146
- Kranzfeld, A. M., s. Dubrowinski, S. B.**
- Kristensen, Martin,** Untersuchungen über die Rolle des Bangschen Abortbazillus als menschenpathogenen Mikroben. 89
- Lange, B., u. Lydtin, K.,** Ein Verfahren der Virulenzbestimmung von Tuberkelbazillen für die Laboratoriumspraxis. 22
- Lauter, R., s. Burtcher, J.**
- Lehr, E.,** Zur Brauchbarkeit des Indolnachweises nach Kovács. 209
- Lichtenstein, Stefania,** Zur Frage der Reinzüchtung der Tuberkelbazillen. 239
- Lieske, Rudolf,** Untersuchungen über die Krebskrankheit bei Pflanzen, Tieren und Menschen. 118
- Lydtin, K., s. Lange, B.**
- Markoff, Wl.,** Bemerkung zu Veröffentlichungen über die sogenannte Pseudobakteriophagie bei Milzbrandbazillen; zugleich Beitrag zur Frage der Variation des Milzbrandbazillus. 371
- Mießner, H., u. Baars, G.,** Entgegnung zu dem Artikel von Dr. Otto Herrmann „Ueber einmalige obligatorische Schutzimpfung der Hunde gegen Tollwut“. 433
- Neisser, H., s. Gutstein, M.**
- Perekropoff, G. J.,** Zur Morphologie der Parasiten der chronischen Malaria. 26
- Prášek, E., u. Prica, M.,** Agglutinationsreaktion bei Rhinosklerom. 376
- Prica, M., s. Prášek, E.**
- Proell, Fr., u. Stiekl, O.,** Streptokokkenbefunde bei Zahnerkrankungen in Beziehung zur Lehre von der oralen Sepsis. 12
- Reymann, G. C.,** Vergleichende Untersuchungen über das Reduktionsvermögen der anaeroben und aeroben Bakterien. 401
- Riedmüller, L.,** Ueber die Morphologie, Uebertragungsversuche und klinische Bedeutung der beim sporadischen Abortus des Rindes vorkommenden Trichomonaden. 103
- Rosenfeld, W. D., s. Dubrowinski, S. B.**
- Rossi-Lema, Libero, s. Sehern, Kurt.**
- Salamandra, E. G., s. Dubrowinski, S. B.**
- Sanfelice, Francesco,** Paravakzination und Paravakzinotherapie bei Krebs. 304
- Sartorius, Fr.,** Ueber Farbstoffwirkung auf Bakterien. III. Mitteilung. 313
- Sehern, Kurt,** Beweist die Mäusepathogenität der aus Ascoli-Positiven Häuten gezüchteten Milzbrandstämme etwas für die Gefährlichkeit solcher Häute? 369
- u. **Rossi-Lema, Libero,** Ueber Trypanosomen. VII. Mitteilung: Blutzuckerwerte bei experimentell mit *Mal de Caderas* infizierten Tieren. 394
- Schiller, Ignaz,** Zur Frage der Züchtung der Tuberkelbazillen im negativen Auswurf. 1
- Schmidt, Franz,** Zur Frage der Pathogenität des *Bacillus suipestifer*. 276
- Schubert, Johann,** Fettsäuren und Mycoides-Lysin. 151
- Schüffner, W.,** Malaria tertiana. Die Entwicklung der Sporulationsform, Doppelinfektionen und Bemerkungen über die sogenannte Parthenogenese der Makrogameten. 297
- Berichtigung zur Arbeit „Malaria tertiana“. 456
- Sehumaeher, Josef,** Das Ektoplasma der Hefezelle. Untersuchungen über die chemische Zusammensetzung der Zellmembran und der Kittsubstanz der Hefezelle. 193
- Sprehn, C.,** *Diplogaster lirata* (Schneider, 1866), Oerley, 1885, ein freilebender Nematode im Urin eines Mannes. 310
- Stähelin, Ad., s. Berger, E.**
- Stiekl, O., s. Proell, Fr.**
- Takayanagi, G.,** Agglutinatorische Einteilung von *Bacillus faecalis alcaligenes*. 383
- Agglutinatorische Einteilung von *Coccobacillus foetidus ozaenae* von Perez. 388
- Tazawa, Y.,** Eine neue Variante von Paratyphus B Schottmüller. 219
- Wolters, K. L., u. Dehmel, H.,** Zur Züchtung und Differenzierung der anaeroben Sporenbildner, unter besonderer Berücksichtigung der Rauschbrand- und Pararauschbrandbazillen. 264
- Yakimoff, W. L.,** Zur Frage der Immunität bei Piroplasmen des Rindes. 438

II. Sachverzeichnis.

Abortus, sporadischer, der Rinder, Bedeutung der Trichomonaden für denselben.	103	Bakteriophagie beim <i>Bac. rhinoscleromatis</i> .	376
Acanthocephalen der Fische.	146	— Pseudo-, der Milzbrandbazillen.	371
Allergie durch Askariden.	449	Blastomycetes neoformans.	304
Anaërobierzüchtung, Plattenverfahren, einfaches, für dieselbe.	155	— paraneoformans, Wirkung auf Krebs des Menschen und auf Rattensarkom.	304
Ancylostoma, Verbreitung in Turkmenistan.	172	Blutzuckerwerte bei Mal de Caderas.	394
Antivirus, biologische Eigenschaften.	341	<i>Coccobacillus foetidus ozaena</i> , agglutinatorische Einteilung.	388
Ascoli-Reaktion bei Milzbrandhäuten.	369	Desinfektionsversuche, Deutung der Ergebnisse.	327
Askariden, Allergie durch dieselben.	449	<i>Diplogaster lirata</i> .	310
Auswurf, Tuberkelbazillenzüchtung aus denselben.	1	<i>Echinorhynchus baeri</i> .	148
<i>Bac. abortus</i> Bang, Menschenpathogenität desselben.	89	Ektoplasma der Hefezelle.	193
<i>Bac. avisepticus</i> , Kapselsubstanz desselben.	87	Encephalitisvirus, experimentelle Untersuchungen.	58
<i>Bac. der</i> böartigen Euterentzündung.	280	Ernährung, Einfluß derselben auf die natürliche Resistenz.	413
<i>Bac. coli alcaligenes</i> .	213	Farbstoffwirkung auf Bakterien.	313
<i>Bac. diphtheriae</i> , Polkörnchennachweis.	353	Fermente der Staphylokokken.	241
<i>Bac. enteritidis</i> , Wachstum auf Gelatineplatte.	223	Fettsäuren und Mycoides-Lysin.	151
<i>Bac. faecalis alcaligenes</i> , agglutinatorische Einteilung.	383	Fische, Acanthocephalen bei denselben.	146
<i>Bac. mallei</i> , Virulenzbestimmung.	177	<i>Gastrophilus pecorum</i> , Larve, Morphologie und Biologie.	163
<i>Bac. paratyphi B</i> , Schottmüller, neue Variante.	219	Gelatineplatte zur Unterscheidung von <i>Bac. paratyphi B</i> , <i>Bac. enteritidis</i> und <i>Bac. suipestifer</i> .	223
— — — — Wachstum auf Gelatineplatte.	223	Gonokokken, Kultur derselben.	356
<i>Bac. pyogenes</i> .	280	Gonorrhöe, Kaninchen-, experimentelle.	245
<i>Bac. rhinoscleromatis</i> , Bakteriophage gegen denselben.	376	Häute, Milzbrand-, Gefährlichkeit derselben.	369
<i>Bac. suipestifer</i> , Pathogenität für den Menschen.	276	Hakenwurmverbreitung in Turkmenistan.	172
<i>Bac. suipestifer</i> , Wachstum auf Gelatineplatte.	223	Hefezelle, Ektoplasma derselben.	193
<i>Bact. tumefaciens</i> .	118	Herpesvirus, experimentelle Untersuchungen.	58
Bakterien, anaërobe, Plattenverfahren, einfaches, zur Züchtung derselben.	155	Hunde, Schutzimpfung gegen Wut.	433
— Sporenbildner, Züchtung und Differenzierung derselben.	264	Indolnachweis.	209
— — und aërobe, Reduktionsvermögen derselben.	401	Konservierung von Bakterienkulturen.	160
—, Farbstoffwirkung auf dieselben.	313		
— -Kulturen, Konservierung derselben.	160		
—, säurefeste, Schicksal derselben im tierischen Organismus.	41		

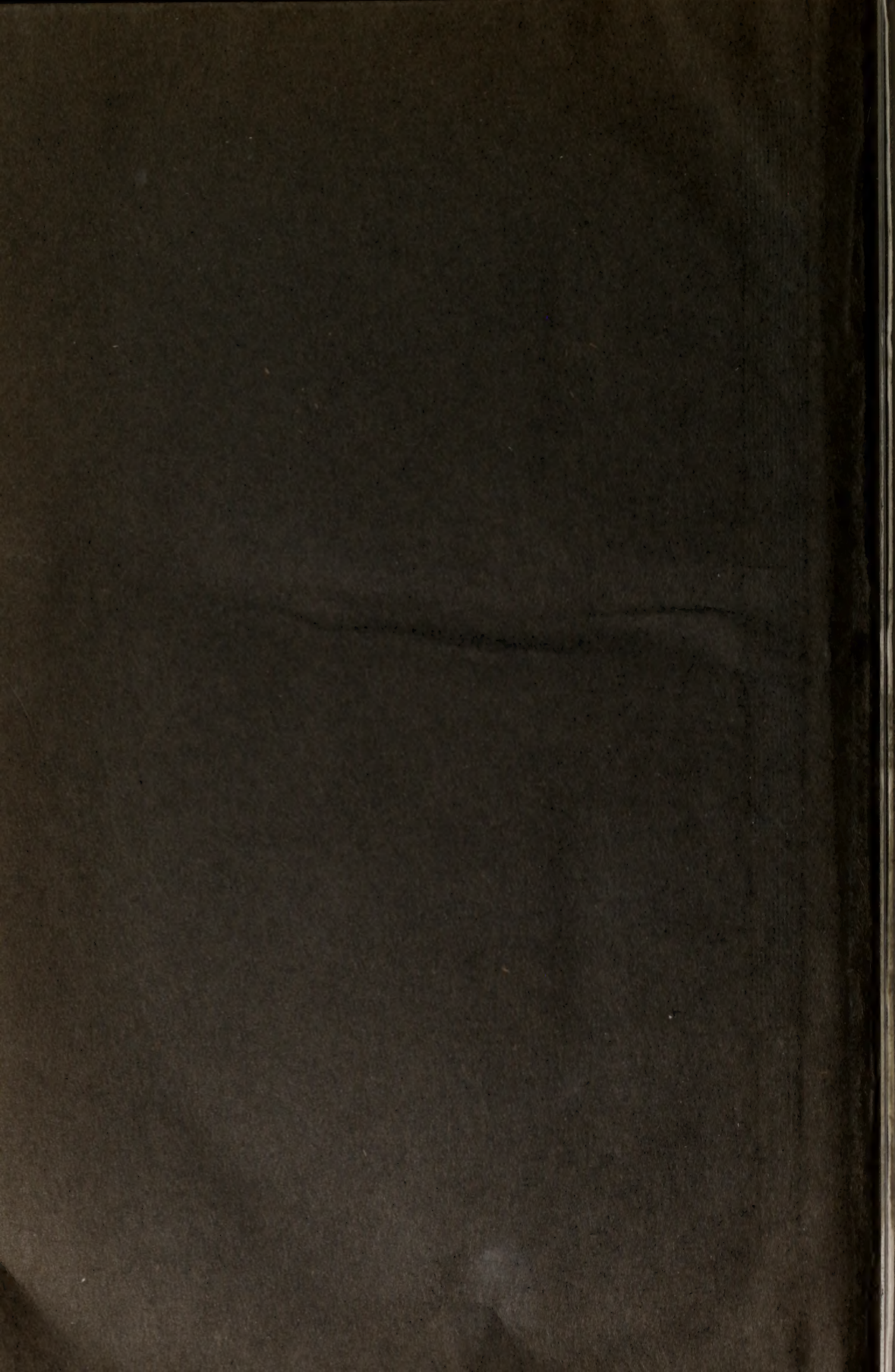
Krebs, Paravakzination und Paravakzino- therapie.	304	Rotzkulturen, virulente- und avirulente, Dif- ferenzierung derselben.	177
Krebskrankheiten bei Pflanzen, Tieren und Menschen.	118	Schimmelpilzpräparate für Kurszwecke.	207
Lysin, Mycoides-, und Fettsäuren.	151	Sepsis, orale, und Zahnerkrankungen.	12
Mal de Caderas, Blutzuckerwerte.	394	Spirochaeta pallida, Nachweis derselben in den Lymphdrüsen von Paralytikern.	247
Malaria, chronische, Morphologie der Para- siten derselben.	26	— —, Plattenkultur.	155
— tertiana, Parasitologie.	297, 456	Sputum s. Auswurf.	
Methylenblaureaktion zur Differenzierung virulenter und avirulenter Rotzbazillen.	177	Staphylokokkenfermente.	241
Milzbrandbazillen, Mäusepathogenität.	369	Staphylokokkenfiltrate, Analyse der immuni- sierenden Wirkung derselben.	341
—, Pseudobakteriophagie.	371	Streptokokken bei Zahnerkrankungen.	12
—, Variation.	371	Streptotrichosis dentium rubra.	258
Mycoides-Lysin und Fettsäuren.	151		
Ozaena, Aetiologie.	388	Timotheebazillus, Schicksal derselben im tierischen Organismus.	41
Paraffin zur Konservierung von Bakterien- kulturen.	160	Trichinella spiralis, Jodaufspeicherung und Jodbindung durch dieselben.	186
Pararanschbrandbazillen, Züchtung und Dif- ferenzierung.	264	— — Mechanismus der Infektion.	397
Parasiten des Darmes, Verbreitung in der Türkei.	393	Trichomonaden beim sporadischen Rinder- abortus, Morphologie, Uebertragungsver- suche, Bedeutung.	103
Pflanzenkrebs, Untersuchungen über den- selben.	118	Trypanosomeninfektionen, Blutzuckerwerte bei denselben.	394
Piroplasmen des Rindes, Immunität bei denselben.	438	Tuberkelbazillen, Kultur derselben.	1, 239
Pocken s. a. Variolavakzine.		—, Nachweis, mikroskopischer.	7
Poliomyelitisvirus, experimentelle Unter- suchungen.	58	—, Virulenzbestimmung.	22
Pomphorhynchus laevis.	150	Türkei, Verbreitung von Darmparasiten in derselben.	393
Pseudobakteriophagie der Milzbrandbazillen.	371	Turkmenistan, Ancylostoma-Verbreitung.	127
Quadrigyus cholodkowskyi.	147		
Rauschbrandbazillen, Züchtung und Dif- ferenzierung.	264	Variolavakzine und Wut, Immunitätsbezie- hungen.	254
Reduktionsvermögen der Bakterien.	401	Virulenzbestimmung von Tuberkelbazillen.	22
Resistenz, natürliche, Einfluß der Ernährung.	413	Virus, kryptantigenes.	454
Rhinosklerom, Agglutinationsreaktion.	376		
Rinderabortus, sporadischer, Bedeutung der Trichomonaden für denselben.	103	Wut, Schutzimpfung der Hunde gegen die- selbe.	433
Rinderpiroplasmen, Immunität bei den- selben.	438	— und Variolavakzine, Immunitätsbezie- hungen.	254
		Wutvirus, Vorkommen im Gehirn.	49, 52
		Wut, Virus fixe-Emulsionen und Lähmungen.	430
		Zahnbelag, mykotischer, purpurroter.	258
		Zahnerkrankungen und orale Sepsis.	12

III. Verzeichnis der Abbildungen.

Anaërobenkultur im Plattenverfahren.	156, 157	Malaria, chronische, Morphologie der Parasiten. (Taf.)	40
Ancylostoma-Verbreitung in Turkmenistan.	174	— tertiana, Entwicklung der Parasiten. (Taf.)	298, 301, 304, 456
Bac. pyogenes.	283, 288, 289	Paraffinabschluß zur Konservierung von Bakterienkulturen.	161
Bakteriophagie bei Bac. rhinoscleromatis. (Taf.)	383	Quadrigyrus cholodowskyi.	147
Bazillen der bösartigen Euterentzündung.	284, 289	Rauschbrand- und Pararauschbrandbazillen, Kultur und Differenzierung.	265—267, 270
Desinfektionsversuche.	329, 333, 337	Reduktionsvermögen der Bakterien.	405, 407, 409
Diplogaster lirata.	311, 312	Schimmelpilzpräparate.	208
Echinorhynchus baeri.	148	Streptotrichosis dentium rubra. (Taf.)	264
Gastrophilus pecorum. (Taf.)	172	Trichina spiralis, Jodaufspeicherung und Jodbindung. (Taf.)	192
Gelatineplatte zur Unterscheidung der Paratyphus B-, Enteritis- und Suipestifer-Bakterien. (Taf.)	238	Trichomonaden, Vorkommen beim sporadischen Abortus der Rinder.	108
Hefezelle, Ektoplasma derselben.	195		
Krebskrankheit bei Pflanzen, Tieren und Menschen. (Taf. I—III.)	144		







Gift of Miss Helen Page
Colo. Foundation for research in tuberculosis

